



JAPANESE PATENT OFFICE

(19)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 2002060400 A  
(43) Date of publication of application: 26.02.2002

(51) Int. Cl. C07K 19/00  
A61K 38/00, A61K 47/48, A61P 9/10, C07K 14/515, C07K 14/78,  
C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10  
//C12N 15/09

(21) Application number: 2000247379  
(22) Date of filing: 17.08.2000  
(71) Applicant: TERUMO CORP  
(72) Inventor: ISHIKAWA TETSUYA  
KITAJIMA TAKASHI

(54) HYBRID POLYPEPTIDE HAVING  
COLLAGEN-BINDING ACTIVITY AND  
ANGIOGENESIS MODULATING ACTIVITY

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a hybrid polypeptide having both of an angiogenesis modulating activity and a collagen-binding activity and is useful as a DDS for an angiogenesis modulating factor, and a conjugated biomaterial of the hybrid polypeptide and collagen, and further to provide a transformation sys-

tem including a gene encoding the hybrid polypeptide.

SOLUTION: The objective hybrid polypeptide is obtained by linking a polypeptide having an amino acid sequence constituting a collagen-linking domain prepared by hydrolyzing fibronectin with a protease to the angiogenesis modulating factor through a genetic engineering technique. The angiogenesis modulating factor is linked to the carboxyl terminus of a collagen-linking FN(fibronectin) polypeptide.

COPYRIGHT: (C)2002.JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2002-60400  
(P2002-60400A)

(43)公開日 平成14年2月26日(2002.2.26)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 0 7 K 19/00		C 0 7 K 19/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 47/48	4 B 0 6 5
	47/48	A 6 1 P 9/10	4 C 0 7 6
A 6 1 P 9/10		C 0 7 K 14/515	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/515		14/78	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 33 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-247379(P2000-247379)

(22)出願日 平成12年8月17日(2000.8.17)

(71)出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72)発明者 石川 哲也

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(72)発明者 北嶋 隆

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(74)代理人 100080159

弁理士 渡辺 望穂 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コラーゲン結合活性および血管新生調節活性を有するハイブリッドポリペプチド

(57)【要約】

【課題】血管新生調節活性およびコラーゲン結合活性の両活性を有し、血管新生調節因子のDDSとして有用なハイブリッドポリペプチド、さらに該ハイブリッドポリペプチドとコラーゲンとの複合化バイオマテリアル、およびこれらの用途の提供。該ハイブリッドポリペプチドをコードする遺伝子を含む形質転換システムの提供。

【解決手段】フィブロネクチンのプロテアーゼ分解により得られるコラーゲン結合性ドメインを構成するアミノ酸配列からなるポリペプチドと、血管新生調節因子とが遺伝子工学的手法により連結したハイブリッドポリペプチド。血管新生調節因子は、コラーゲン結合性FNポリペプチドのカルボキシル末端に連結されている。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】フィブロネクチンのプロテアーゼ分解または自然分解により得られ、かつコラーゲン結合性ドメインを構成するアミノ酸配列、あるいは該配列と相同または1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるコラーゲン結合性ポリペプチドと、血管新生調節因子とが連結されてなり、コラーゲン結合活性および血管新生調節活性を有するハイブリッドポリペプチド。

【請求項2】前記コラーゲン結合性ポリペプチドが、フィブロネクチンのアミノ末端から約28KDaから約75KDaまでに位置する請求項1に記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項3】前記コラーゲン結合性ポリペプチドが、ヒト・フィブロネクチンのAla<sup>59</sup>からTrp<sup>99</sup>までのアミノ酸配列からなるヒト・フィブロネクチン由来のポリペプチドであるか、あるいは該配列と相同であるか、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである請求項1または2に記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項4】前記血管新生調節因子が前記コラーゲン結合性ポリペプチドのカルボキシル末端に連結されている請求項1～3のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項5】前記血管新生調節因子が血管新生促進因子である請求項1～4のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項6】前記血管新生調節因子がPDGFスーパーファミリーに属する細胞成長因子である請求項1～5のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項7】前記血管新生調節因子がVEGFである請求項1～6のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項8】前記血管新生調節因子と前記コラーゲン結合性ポリペプチドとが遺伝子工学的的手法により連結されている請求項1～7のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項9】バクテリアで産生される請求項1～8のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項10】水溶性である請求項1～9のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項11】コラーゲンに結合後、結合を保持したまままたは徐放されることにより血管新生調節活性を示す請求項1～10のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチド。

【請求項12】請求項1～11のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチドを含有する血管新生調節因子の局所維持剤、徐放剤または血管新生調節活性付与剤。

【請求項13】請求項1～11のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチドと、コラーゲン由来のポリペプチド

とが複合化された血管新生調節因子複合化コラーゲンを含有するバイオマテリアル。

【請求項14】請求項13に記載のバイオマテリアルを含有する血管新生調節因子の局所維持剤、徐放剤または血管新生調節活性付与剤。

【請求項15】請求項1～11のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項16】請求項15に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、コラーゲン結合性と血管新生調節活性の両活性を有するハイブリッドポリペプチド、これをコードする遺伝子を含む組換えベクターおよび形質転換体、該ハイブリッドポリペプチドを含むバイオマテリアルおよびこれらの用途に関する。

【0002】

【従来の技術】サイトカイン、細胞成長因子などの血管新生調節因子の中には、医薬品としての用途を期待されているものが多い。例えばPDGF（血小板由来増殖因子）スーパーファミリーの一つであるVEGF（血管内皮細胞増殖因子）は、培養内皮細胞の増殖、遊走、バスキュラリゼーションやコラーゲン分解などのプロテアーゼ活性、およびコラーゲンゲル中での血管様構造形成など、いわゆる血管新生のすべてのステップを促進し、血管透過性も著しく促進する。VEGFは、in vivoでも血管新生を促進することから、心臓あるいは下肢の虚血部位における血管新生療法や血管内皮細胞損傷後の血管内皮細胞修復における効果が期待されている。

【0003】ところが血管新生調節因子は一般的に生体内での安定性が悪く、局所保持あるいは徐放が困難なために標的組織での効果が低い。このため活性を得るためには大量投与が必要とされるが、一方大量投与による他部位での副作用が懸念されるため、実用性が危惧されているものが多い。たとえば上記VEGFも、生体内での安定性、局所での効果が低いが、これを大量投与した場合には、他部位に拡散して血管新生し、ガンを増殖促進するなどの副作用が懸念される。そのため血管新生調節因子の効率のよいドラッグデリバリーシステム（DDS）が切望されている。

【0004】上記血管新生調節因子の生体内での安定性および局所効果を改善し、ターゲティング効果を付与方法として、コラーゲンをキャリアーまたはマトリックスとして利用することが期待されている。しかしながら血管新生調節因子は一般的にコラーゲンとの親和性が低く、これらを単に混合するだけでは、血管新生調節因子を長時間、安定にコラーゲンマトリックスに保持することは困難である。一方血管新生調節因子とコラーゲンを化学的に結合すると、その血管新生調節活性が消

失または低下してしまう。

【0005】また近年、盛んに開発が進められている遺伝子組換え技術によれば、血管新生調節因子と他のポリペプチドとの機能性ハイブリッドポリペプチドを *Escherichia coli* (*E. coli*) 等で発現させることも可能であると考えられる。しかしながら遺伝子工学的にハイブリッド化したポリペプチドは必ずしも元の活性を示すとは限らないという問題がある。特にポリペプチドに、コラーゲン結合活性を付与しようとするハイブリッド化例では、大腸菌で産生された封入体から回収された組換えタンパクの多くで、そのコラーゲン結合活性が損なわれており、かつ生理活性の低下も認められている。また血管新生調節因子とコラーゲン結合性ポリペプチドとのハイブリッド化によりコラーゲン結合後も血管新生調節活性を示すようなハイブリッドポリペプチドを得た例は報告されていない。

【0006】コラーゲン結合活性の付与についてさらに述べれば、細胞外マトリックスを介しての徐放効果をねらったものとして、ウシフォンビルブランド因子由来のコラーゲン結合性デカペプチド (decapeptide) を用いたハイブリッドポリペプチドがいくつか報告されており、該デカペプチドとトランスフォーミング増殖因子β (TGF-β) とのハイブリッド化によるコラーゲンターゲティングTGF-β (USP5,800,811, Tuan ら, *Connective Tissue Research*, 第34巻, 1号, 1~9頁 (1996), Han ら, *Protein Expression and Purification*, 第11巻, 169~178頁 (1997), Gordon ら, *Human Gene Therapy*, 第8巻, 1385~1394頁 (1997)), および該デカペプチドと血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とのハイブリッドポリペプチド (WO00/06195) などが提案されている。

【0007】これらの中で、コラーゲン結合活性の残存したハイブリッドポリペプチドはコラーゲンに結合させた後、細胞の捕捉は可能であったが、TGF-βの活性、特に増殖活性は認められないと報告しており、TGF-β増殖活性の局所保持や徐放の目的は達成されていない。このためハイブリッドポリペプチドであるコラーゲン結合性生理活性ポリペプチドのコラーゲン結合性ペプチド部分としては、フォンビルブランド因子のコラーゲン結合性デカペプチドは適切とはいえない。

【0008】また Nishi らは、嫌気性のグラム陽性桿菌であるクロストリジウム ヒストリチカム (*Clostridium histolyticum*) のコラーゲナーゼ由来のコラーゲン結合性ポリペプチドと、bFGF または上皮増殖因子 (EGF) とのハイブリッドポリペプチドであるコラーゲン結合性細胞増殖因子の作製を試みている (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 第95巻, 7018~7023頁 (1998))。このコラーゲン結合性細胞増殖因子は、コラーゲンコートされた細胞培養器または多くのコラーゲン材料に対し結合不能であったことから、充分なコラーゲン結合活性を有

していないことが記載されている (*Proc. Nat. Acad. of Sci. USA*, 第95巻, 7018~7023頁 (1998))。当然の事ながら、コラーゲン材料に結合後、細胞増殖活性を示すことは不可能である。さらにこのコラーゲン結合性細胞増殖因子では、元のEGF活性が低下することが認められている。また細菌のコラーゲナーゼ由来のポリペプチドは、免疫学的にヒトの組織再生に適切ではない。

【0009】またコラーゲン結合性ポリペプチドとして、細胞外マトリックス成分の一つであるフィブロネクチン (FN) のコラーゲン (ゼラチン) 結合性ポリペプチドを用いる例も提案されている。たとえばUSP5,342,762、USP5,460,955では、有用タンパク質を、バキュロウイルス発現システムによる昆虫細胞で生産、精製するか、または動物細胞 (COS細胞) を宿主にして生産、精製する際に、フィブロネクチンのコラーゲン/ゼラチン結合性ポリペプチドを精製タグとして用いている。

【0010】上記では、フィブロネクチン由来のポリペプチド (タグ) と有用タンパク質とのハイブリッドポリペプチドを発現させ、タグのコラーゲン/ゼラチンへの親和性によって、捕捉させた後、次いで特異的なプロテアーゼ等により、切断し有用タンパク質部分を回収している。ここで得られたハイブリッドポリペプチドは、フィブロネクチンのゼラチン結合性領域のアミノ末端側にトリプシンによる切断部位が位置し、そのアミノ末端側に有用タンパク質が位置し、続いてファクターXI IIa サイトが位置し、さらにそのアミノ末端側にフィブロネクチンのプレプロ配列またはリーダーシグナルペプチド配列が付加された構造である。これにより有用タンパク質の例としてフィブロネクチンのホモロジーユニットI-12 (12番目のI型ホモロジーユニット)、フィブロネクチンのホモロジーユニットI-9 (9番目のI型ホモロジーユニット) とIII-1 (1番目のIII型ホモロジーユニット) またはヒトのファクターIXのさまざまな部分の発現、精製例が示されている。

【0011】しかしながらいづれにも、フィブロネクチン由来のポリペプチドのパートナーとして血管新生調節活性因子をハイブリッド化したことは示されていない。またこれらでは、発現されるハイブリッドポリペプチドについて、コラーゲン結合性以外の有用タンパク質の生理活性があるか否かについては全く検討されていない。また上記構成では、活性を有するハイブリッドポリペプチドを *E. coli* などのバクテリアで産生させることは不可能である。

【0012】またフィブロネクチンのコラーゲン結合性ポリペプチドを利用した他の例としては、該フィブロネクチンのコラーゲン結合部分と、他のポリペプチドまたは治療剤とが結合したポリペプチドおよびその精製法 (特開昭62-89699号) がある。上記特開昭62-89699号公

報では、ヒト・FNのCys<sup>277</sup>からSer<sup>177</sup>（アミノ酸に付した肩数字はヒト・FNのN末端から数えた残基数）までのアミノ酸配列で構成されるポリペプチドがコラーゲン結合性部分として開示されている。この配列は、FNのプロテアーゼ分解で得られる配列あるいは自然分解により得られる配列と異なり、制限酵素で切断される遺伝子配列を選択するような遺伝子工学的手法によってのみ産生可能なアミノ酸配列である。しかしながらこのような配列のポリペプチドを血管新生調節因子のポリペプチドパートナーとするハイブリッドポリペプチドでは、コラーゲン結合性または血管新生調節因子の活性が低下または消失する。したがって上記ポリペプチドは、機能性ハイブリッドポリペプチドにおける血管新生調節因子のポリペプチドパートナーとして有用であるとはいえない。

【0013】また同公報では、コラーゲン結合能を有する連続部分としてThr<sup>179</sup>からVal<sup>144</sup>までが記載されているが、このThr<sup>179</sup>からVal<sup>144</sup>までを含むThr<sup>179</sup>からAla<sup>179</sup>までのアミノ酸配列で構成されるポリペプチドにはコラーゲン結合性がないと報告する他の論文（Skorsten qaard ら、FEBS letters、第343 巻、第47～50頁（1994））もある。このようにコラーゲン結合性ドメインに相当するポリペプチドの全てまたは一部の配列を含んでも、プロテアーゼによる分解部位または自然分解による部位を考慮せず、遺伝子工学的手法でのみ得られるようなFN由来のコラーゲン結合性ポリペプチドを血管新生調節因子に融合させて作製したハイブリッドポリペプチドは、コラーゲン結合活性または血管新生調節因子の活性の低下を招く。

【0014】さらにコラーゲン結合性ドメインではないが、フィブロネクチンの細胞接着ドメイン配列からなるポリペプチドと、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）とをハイブリッド化した機能性ポリペプチドの製造法が開示されている（特開平5-178897号公報）。具体的にはヒト・FNのPro<sup>1239</sup>からSer<sup>115</sup>までの277 アミノ酸残基からなるポリペプチドと、bFGFとのハイブリッドポリペプチドである。ヒト・FNのPro<sup>1239</sup>からSer<sup>115</sup>までのアミノ酸残基からなるポリペプチドは、コラーゲン結合性ドメインが位置するヒト・FNのN末端側約28kDaから約75kDaまでに含まれるポリペプチドとは全く異なるアミノ酸配列から構成されており、コラーゲン結合性は有さない。このハイブリッドポリペプチドは細胞に接着し、細胞増殖活性を示すが、一方、細胞に直接結合するため長期的な徐放効果あるいは局所保持は期待できない。また機能性ポリペプチドのbFGFとしての活性は著しく低下することが記載されている。

【0015】さらに他の機能性ポリペプチドのターゲティング技術として、機能性ポリペプチドを細胞外マトリックス（FNポリペプチド）中に挿入して不溶化させる

ことも提案されている。具体的にはFNポリペプチドのN末端70kDa領域とC末端37kDa領域との間に、異種タンパク質（機能性ポリペプチド）または該ポリペプチドのアミノ酸鎖を挿入したキメラタンパク質が提案されている（特開平8-140677号）。しかしながらこのように不溶化されたキメラタンパク質においては、FN分子の間に異種タンパク質またはペプチドのアミノ酸配列を挿入するので、高次構造に影響を及ぼし、挿入タンパク質の機能維持が困難である。また分子量が大きく、水に不溶性であることから、機能を維持したタンパク質として回収することが著しく困難であり、E. coli（大腸菌）、酵母、動物細胞等による工業的生産は事実上不可能である。使用法としてはヒト細胞で直接遺伝子の発現させる遺伝子治療にのみに限定される。

【0016】上記のように遺伝子組換え技術を用いてE. coli 等で発現させても、ハイブリッドポリペプチドは元の活性を示さない場合が多い。また血管新生調節因子のターゲティング技術として、これにフィブロネクチン由来のコラーゲン結合性を付与したハイブリッドポリペプチドを得ることも提案されていない。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、血管新生調節活性およびコラーゲン結合活性の両活性を有し、血管新生調節因子のDDSとして有用なハイブリッドポリペプチドを提供することを目的としている。さらに、血管新生調節因子の局所保持または長期的かつ調節可能な徐放機能を実現するための該ハイブリッドポリペプチドとコラーゲン由来のポリペプチドとを複合化したバイオマテリアル（血管新生調節因子複合化コラーゲン）、およびこれらハイブリッドポリペプチドまたはバイオマテリアルの用途を提供することを目的としている。またハイブリッドポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターおよび該組換えベクターを含む形質転換体を提供することも目的としている。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記のような課題を遺伝子工学的手法で解決すべく検討したところ、フィブロネクチン（以下単にFNとも記す）のコラーゲン結合性ドメインと血管新生調節因子とを連結することにより、血管新生調節活性が維持され、かつコラーゲンに対する結合活性が付与されたコラーゲン結合性血管新生調節因子の製造が可能であることを証明し、さらに該コラーゲン結合性血管新生調節因子とコラーゲン由来のポリペプチドとを複合化させたバイオマテリアル（血管新生調節因子複合化コラーゲン）を考案し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明の課題は以下の1）～15）によって解決される。

【0019】1）本発明に係るハイブリッドポリペプチドは、フィブロネクチン（FN）のプロテアーゼ分解または自然分解により得られ、かつコラーゲン結合性ドメ

10

20

30

40

50

インを構成するアミノ酸配列、あるいは該配列と相同または1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるコラーゲン結合性ポリペプチドと、血管新生調節因子とが連結されてなり、コラーゲン結合活性および血管新生調節活性を有する。

【0020】2) 上記FNのコラーゲン結合性ポリペプチドは、FNのアミノ(N)末端から約28kDaの位置から約75kDaまでの間に位置する。上記プロテアーゼは、トリプシン、キモトリプシン、サーモリシン、プラスミン、トロンビン、カテプシンD、カテプシンG、ペプシン、ズブチリシン、キマーゼ、白血球エラスターゼまたは大腸菌由来のプロテアーゼのいずれかであるかあるいは2種以上の組み合わせが好ましい。プラスミンとキモトリプシンとを併用することがさらに好ましい。

【0021】3) 上記コラーゲン結合性ポリペプチドは、ヒト・フィブロネクチン由来であることが好ましい。具体的に、ヒト・フィブロネクチンのAla<sup>250</sup>からTrp<sup>399</sup>までのアミノ酸配列からなるヒト・フィブロネクチン由来のポリペプチドであるか、あるいは該配列と相同であるか、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであることが好ましい。

【0022】4) 本発明のハイブリッドポリペプチドでは、上記血管新生調節因子は、上記コラーゲン結合性ポリペプチドのカルボキシル末端に連結されている。

【0023】5) 上記血管新生調節因子は、血管新生を促進する血管新生促進因子または血管新生を阻害する血管新生阻害因子である。特に血管新生調節因子は、血管新生促進因子が有用である。血管新生促進因子としては、具体的に、塩基性繊維芽細胞増殖因子及び酸性繊維芽細胞増殖因子などのFGFファミリーに属する細胞成長因子、血管内皮細胞増殖因子(VEGF110、121、165、189、206、-B、-C、-D)、IL-8、IL-4、PD-ECGF、HGF、アンジオジェニン、EGFファミリーに属する細胞成長因子(TGF- $\alpha$ 、ヘパリン結合性EGF様成長因子、EGF、アンフィレグリン、SDGF、ベータセルリン)、血小板由来増殖因子(PDGF)、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、アンジオポエチン-1、プレイオトロフィン、ミッドカイン、組織因子、TNF- $\alpha$ (低濃度)、IGF(インシュリン様成長因子)、CYR61、HGFのNK1ドメインおよびHGFのNK2ドメイン、エフリンB2、マトリックスメタロプロティナーゼ、成長ホルモン、G-CSFなどが含まれる。

【0024】6) 血管新生調節因子としては、具体的にPDGFスーパーファミリーに属する細胞成長因子が挙げられる。PDGFスーパーファミリーに属する細胞成長因子には、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内

皮細胞増殖因子(VEGF)および結合組織成長因子(CTGF)がある。

7) PDGFスーパーファミリーに属する細胞成長因子のうちでも、VEGFが好適であり、特にVEGF121およびVEGF165が好適である。

【0025】8) 本発明のハイブリッドポリペプチドは、血管新生調節因子と、FN由来のコラーゲン結合性ポリペプチドとが遺伝子工学的的手法により連結されたものである。

10 【0026】上記において、血管新生調節因子とFN由来のポリペプチドとの連結部位に、スパーサーとしてアミノ酸またはポリペプチドが挿入されていてもよい。この場合には、スパーサーまたはスパーサーとその隣接配列とのいずれかがプロテアーゼ認識配列を含むものが好ましい。プロテアーゼ認識配列はエンテロキナーゼ、血液凝固因子Xa、トロンビン、プレシジョン、カリクレイン、Genenase Iまたはレニンが好ましい。プロテアーゼ認識配列はエンテロキナーゼの認識配列であることがさらに好ましい。

20 【0027】9) 本発明のハイブリッドポリペプチドは、バクテリアまたは酵母で産生することができる。特にバクテリア好ましくはEscherichia coli(E. coli)で産生することができる。

10) 本発明のハイブリッドポリペプチドは、水溶性である。

【0028】11) 本発明のハイブリッドポリペプチドは、コラーゲンに結合後、結合を保持したままかまたは徐放されることにより血管新生調節活性を示す。

30 12) 本発明は、上記1)~11)のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチドを含有する血管新生調節因子の局所維持剤、徐放剤、または血管新生調節活性付与剤を提供する。

【0029】13) 上記1)~11)のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチドとコラーゲン由来のポリペプチドとが複合化された血管新生調節因子複合化コラーゲンを含有するバイオマテリアル。上記13)に記載のバイオマテリアルを用いて血管新生調節活性を介して細胞、組織、臓器に増殖、分化、再生または物質産生を促進または阻害する方法。

40 14) 上記13)に記載のバイオマテリアルを含有する血管新生調節因子の局所維持剤、徐放剤、または血管新生調節活性付与剤。

【0030】上記ハイブリッドポリペプチドをコードする遺伝子を提供することができる。したがって本発明では、この遺伝子を含む組換えベクター、形質転換体、バクテリアなどの形質転換システムが提供され、具体的に15) 上記1)~11)のいずれかに記載のハイブリッドポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターを提供する。さらに

50 16) 上記15)の組換えベクターを含む形質転換体が

提供される。

【0031】上記形質転換体は、バクテリア、酵母、昆虫細胞および動物細胞を含む。上記1)～11)のいずれかに記載のコラーゲン結合性血管新生調節因子をコードする遺伝子を含有する組換えベクターを含むバクテリア。上記1)～11)のいずれかに記載のコラーゲン結合性血管新生調節因子をコードする遺伝子を含有する組換えベクターを含むE. coli。上記1)～11)に記載のコラーゲン結合性血管新生調節因子をE. coliを用いて生産する方法も挙げられる。

【0032】

【発明の実施の形態】本発明に係るハイブリッドポリペプチドは、フィブロネクチン(FN)由来のコラーゲン結合性ドメインのポリペプチドと、血管新生調節因子とが遺伝子工学的に連結された機能性ハイブリッドポリペプチドすなわちコラーゲン結合性血管新生調節因子である。このハイブリッドポリペプチドは、コラーゲン結合活性および血管新生調節活性の両活性を示し、コラーゲン結合後、血管新生調節活性を示す。

【0033】本発明では、上記のようにコラーゲン結合性ポリペプチドとしてFN由来のコラーゲン結合性ポリペプチドを用いることにより、ハイブリッドポリペプチドのコラーゲン結合活性と血管新生調節活性の両方を良好に維持し、かつコラーゲン結合後の血管新生調節活性も維持されることが確認されており、新規な機能性ハイブリッドポリペプチドであるコラーゲン結合性血管新生調節因子とその用途も提供される。これにより、元来コラーゲン結合性を有さない血管新生調節因子は当然のことながら、コラーゲン結合性を有する血管新生調節因子に対してもFN由来のポリペプチドに依存したコラーゲン結合性を付与することが可能になった。

【0034】ここで「コラーゲン」とは、コラーゲン、あるいはゼラチンなどの熱変性コラーゲンを含む意味で用いられる。したがってコラーゲン結合性は、ゼラチン結合性と同等の意味を有し、本明細書ではこれらを単にコラーゲン結合性またはゼラチン結合性と表記することもある。

【0035】フィブロネクチン(FN)は、血漿、細胞外マトリックス及び培養細胞表面に存在する細胞接着性の糖タンパク質で、コラーゲン(ゼラチン)、ヘパリン、フィブリン及びビインテグリンなどの生体高分子に結合し、細胞接着、組織構築及び組織損傷の修復などの生物学的作用を持つことが知られている(Ruoslahti, Annual Review of Biochemistry、第57巻、第375～413頁(1988))。

【0036】FN由来のポリペプチドのコラーゲン結合活性は、ハイブリッドポリペプチドにおいても強固で非常に安定である。そして、コラーゲンに結合後、結合を保持したまままたは徐放されて血管新生調節活性を示す新規のバイオマテリアルである血管新生調節因子複合

化コラーゲンを完成することが可能となった。

【0037】さらに、本発明のコラーゲン結合性血管新生調節因子は、そのコラーゲン結合性が血漿FNにより競合阻害される性質を持ち、血漿への暴露、その添加または共存下ではコラーゲンからの放出が起こり、血漿の不足した、即ち液性因子(細胞成長因子サイトカインおよび酵素)の飢餓状態にある部位ではコラーゲンに保持される特徴を持つのである。したがってコラーゲン結合性血管新生調節因子の作製において、コラーゲン結合性ポリペプチド部分としてFN由来のコラーゲン結合性ポリペプチドを用いたことが本発明の完成の鍵になっている。

【0038】現在、組換えDNA技術、遺伝子工学の技術によれば、FN由来のどの部分のポリペプチドの遺伝子でも血管新生調節因子の遺伝子との融合遺伝子を作製することが原理的には可能である。しかしながら、コラーゲン結合性および血管新生調節活性を維持したままハイブリッドポリペプチド(融合タンパク質)を作製するには、適切なコラーゲン結合性ポリペプチド配列の選択が必要である。この配列の選択も本発明の一つである。

【0039】<FN由来のポリペプチド(FNCBD)>すなわち本発明を構成するFN由来のポリペプチドとは、FN由来のコラーゲン結合性ポリペプチドであり、FNの自然分解またはプロテアーゼ分解により得られる。好ましくはプロテアーゼによる限定分解で得られる。このFNのコラーゲン結合性ポリペプチドは、FNのアミノ末端から約28kDaの位置から約75kDaまでの間に位置する。

【0040】具体的に、上記FN由来のポリペプチドは、コラーゲンおよび/またはゼラチンに対して結合活性を有するFN由来のコラーゲン結合性ドメインを構成するポリペプチドを構成するアミノ酸配列と、全て相同であるかまたは1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加された配列であることが好ましい。なお本発明において、欠失、置換、挿入もしくは付加される数個のアミノ酸とは、連続した3個以下のアミノ酸であることが望ましい。

【0041】上記プロテアーゼとしては、好ましくはトリプシン、キモトリプシン、サーモリシン、プラスミン、トロンビン、カテプシンD、カテプシンG、ペプシン、ズブチリシン、キマーゼ、白血球エラスターゼ、またはE. coli由来のプロテアーゼなどが挙げられ、これらのいずれか或いは2種以上組合わせが挙げられる。これらのうちでも、プラスミンとキモトリプシンとを併用することが好ましい。FNは、ヒトFNが好ましいが、他の動物種のFNでもよい。

【0042】したがって本明細書において、FNのコラーゲン結合性ドメインとは、実質的にFNのアミノ末端から約28kDaの位置から約75kDaまでの間に位置し、トリプシン、キモトリプシン、サーモリシン、ブ



ラスミン、トロンビン、カテプシンD、カテプシンG、ペプシン、ズブチリシン、キマーゼ、白血球エラスターゼ、またはE. coli 由来のプロテアーゼのいずれかまたはそれらプロテアーゼの組み合わせのいずれかにより限定分解されたFN由来のコラーゲン/ゼラチン結合性ポリペプチドを意味する。

【0043】より具体的にはトリプシン、サーモリシンまたはズブチリシンの限定分解で得られる約30kDaのコラーゲンまたはゼラチン結合性ポリペプチド、あるいはプラスミンとキモトリプシンの限定分解、カテプシンDとトロンビンの限定分解、白血球エラスターゼの限定分解、サーモリシンの限定分解、またはキマーゼの限定分解で得られるコラーゲンまたはゼラチン結合性の約39~45kDaのポリペプチドまたはプラスミンとキモトリプシンの限定分解で得られるヒトFNのA1a<sup>60</sup>からTrp<sup>99</sup>までのポリペプチドなどである。

【0044】上記のようなコラーゲン結合性FNポリペプチドの別の具体例として、たとえばヒトFNのA1a<sup>160</sup>からTrp<sup>99</sup>までのポリペプチドを構成するアミノ酸配列あるいは、該配列と相同であるかまたはその一部置換、欠失、挿入または付加体である配列が挙げられる。別の具体例として、本発明のヒトFN由来のポリペプチドとして、(1)ヒトFNのA1a<sup>60</sup>からTrp<sup>99</sup>までのポリペプチドを構成するアミノ酸配列であるか、該配列と相同であるか、またはそれらの一部欠失体または一部置換、欠失、挿入または付加体と同一の配列であり、かつカルボキシル末端がヒトFN由来のアミノ酸であるプロテアーゼ認識配列を有するもの、(2)ヒトFNのA1a<sup>60</sup>からTrp<sup>99</sup>までのポリペプチドを構成するアミノ酸配列の全てを含む配列であるか、該配列と相同であるか、またはそれらの一部置換、欠失、挿入または付加体と同一の配列、(3)プロテアーゼによる限定分解でヒトFNのA1a<sup>60</sup>からTrp<sup>99</sup>までのポリペプチドから得られ、かつコラーゲン/ゼラチンに対して結合活性を有するポリペプチドを構成するアミノ酸配列であるか、該配列と相同であるか、またはその一部置換、欠失、挿入または付加体である配列が挙げられる。

【0045】上記のようなFNポリペプチドをポリペプチドパートナーとするハイブリッドポリペプチドにおいてゼラチン結合性が維持される事は、例えば本願実施例で用いたヒト・FNのA1a<sup>60</sup>からTrp<sup>99</sup>までのポリペプチドと血管新生調節因子から成るハイブリッドポリペプチドを上述のプロテアーゼで限定分解して得られるポリペプチドのゼラチン結合活性を調べることで比較的簡単に確認できる。またゼラチン結合性の程度は、高濃度の塩たとえば2M NaCl存在下での結合の維持、あるいは血漿FNとの競合阻害実験で調べることができる。

【0046】なお、プロテアーゼによる限定分解で得られ、かつゼラチンに対して結合活性を有するFN由来の

ポリペプチドを構成するアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列との僅かな相違ではハイブリッドポリペプチドのコラーゲン結合活性を消失させない例もある得る。

【0047】ただし、ほとんどの場合、コラーゲン結合性ドメインの全てまたは一部の配列を含んでいても、プロテアーゼによる分解部位を全く無視して遺伝子工学的手法でのみ得られるようなFN由来のアミノ酸配列を血管新生調節因子に融合させて大腸菌で発現させたハイブリッドポリペプチドは、著しくコラーゲン結合活性の低下を招く。

【0048】従って、遺伝子工学的手法によりハイブリッドのコラーゲン結合性血管新生調節因子を作製する場合でも、FN由来のコラーゲン結合性ポリペプチドの配列選択には、プロテアーゼによる限定分解で得られるゼラチン結合性のポリペプチドと相同の配列を選択して作製するのがよい。

【0049】プロテアーゼによる切断部位は、例えばトリプシンではアルギニンとリジンのC末端側、キモトリプシンではイソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびスレオニンのC末端側、サーモリシンではイソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンのC末端側、プラスミンではアルギニンとリジンのC末端側、トロンビンではアルギニンとグリシンの間、カテプシンDではリジン、チロシン、フェニルアラニンおよびアルギニンのC末端側、ペプシンではロイシン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンのC末端側、白血球エラスターゼではグリシン、アラニンまたはバリンなどの側鎖の短いアミノ酸が2~3個連続しているアミノ酸のC末端側、カテプシンGはロイシン、チロシン、フェニルアラニンのC末端側、ズブチリシンはアラニンのC末端側などである。

【0050】ただし、実際のFNの分解において、特に限定分解においては、高次構造に依存して切断され易い箇所と切断され難い部位があり、切断され易い箇所は限定される。つまり、プロテアーゼの限定分解で得られるコラーゲン/ゼラチン結合性のポリペプチドの種類は非常に限られている。

【0051】従って、遺伝子工学的作製でコラーゲン結合性ポリペプチド部分の区切りを選択する場合にもプロテアーゼで切断され易い部位を区切りとして選択するのである。FNのプロテアーゼに切断されやすい部位及びゼラチン結合性は、文献または実際にFNをプロテアーゼで限定分解し、ゼラチンに結合するポリペプチドのアミノ末端、カルボキシル末端またはアミノ酸配列を決定するなどその部位を調べられる。この文献としては、Ruoslahtiら、J. Biol. Chem., 第254巻、第6054-6059頁(1979)、Balianら、J. Biol. Chem., 第254巻、第1429-32頁、(1979)、Ruoslahtiら、J. Biol. Chem., 第254巻、第6054-6059頁(1979)、Hahnら、Proc.

10

20

30

40

50



Natl. Acad. Sci., 第76巻、第1160-1163頁(1979)  
、Goldら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 第76  
巻、第4803-7頁、(1979)、Furieら、J. Biol. Chem.  
第255巻、第4391-4頁、(1980)、Engvallら、Coll.  
Relat. Res., 第1巻、第505-516頁(1981)、McDonald  
ら、J. Biol. Chem., 第256巻、第5583-7頁(198  
1)、Vartioら J. Biol. Chem. 第256巻、第471-7  
頁(1981)、De Petroら Proc. Natl. Acad. Sci. U  
S.A. 第78巻、第4965-9頁(1981)、Ruoslahtiら、J. B  
iol. Chem., 第256巻、7277-81頁(1981)、Vartioら  
Eur. J. Biochem. 第123巻、第223-33頁、(1982)、Pe  
tersenら、Proc. Natl. Acad. Sci., 第80巻、第137-14  
1頁(1983)、Skorstengaardら、Eur. J. Biochem.,  
第140巻、第235-243頁(1984)、Zardiら、Eur. J.  
Biochem., 第146巻、第571-579頁(1985)、Skorstenga  
ardら、Eur. J. Biochem., 第161巻、第441-453頁  
(1986)等を利用することができる。

【0052】なお現在まで、FN由来のコラーゲン結合  
性ポリペプチドを同定する研究が多く、研究者によって  
なされたが、各研究者の報告で対立があり、いまだに不  
明な点が多く残されている(Owensら、EMBO J., 第5  
巻、第2825-2830頁(1986)、Inghamら、J. Biol. Che  
m., 第264巻、第16977-16980頁(1989)、Litvinov  
ichら、J. Mol. Biol., 第217巻、第563-575頁(19  
91)、Banyaiら、Eur. J. Biochem., 第193巻、第801  
-806頁(1990)、Skorstengaardら、FEBS letters,  
第343巻、第47-50頁(1994)、Shimizuら、Biochimi  
ca et Biophysica Acta, 第1339巻、第53-61  
頁(1997))。本発明者らによれば、それらの報告の不  
一致は遺伝子工学的に産生されたポリペプチドとプロテ  
アーゼ処理で得られたポリペプチドを同様に考えて議論  
しているので生じると判断される。

【0053】遺伝子工学的にFN由来のポリペプチドを  
産生する際、不適切な部位で配列を区切り、さらに精製  
タグを付加する事は、本来コラーゲン結合性を有する  
領域でもその活性を消失または低下させる原因となっ  
ている。特にハイブリッドポリペプチド中においては、F  
N由来のポリペプチド単体でコラーゲン/ゼラチン結合  
性を有していてもその結合性が維持されない場合が多  
い。すなわち、本来の高次構造をゆがめる原因になり、  
機能しなくなるのである。

【0054】本発明のコラーゲン結合性血管新生調節因  
子は、上述したような適切な部位で配列を区切り、かつ  
精製タグを付加しないFNのコラーゲン結合性ポリペ  
プチドを血管新生調節因子に融合させて作製する。本発  
明のコラーゲン結合性血管新生調節因子は、E. coliで  
生産された組換えハイブリッドポリペプチドとして、F  
Nのコラーゲン/ゼラチン結合性によりゼラチンセファ  
ロースに結合し、容易にアフィニティー精製可能であ  
り、血管新生調節因子に由来する血管新生調節活性も良

好に維持している。なお、本発明はハイブリッドポリペ  
プチドの生産、精製のみならず、特異配列認識プロテ  
アーゼなどを併用した血管新生調節因子の生産、精製シ  
ステムとしても適用可能である。

【0055】なおコラーゲン結合性ポリペプチドの配列  
としては、FNに由来するもの以外では、マトリックス  
メタロプロテアーゼであるコラゲナーゼ及びゼラチナ  
ーゼ並びに細胞外マトリックスではフォンビルブランド因  
子、デコリン、ヒグリカン、フィブロモジュリン、ルミ  
カン、オステオネクチン、ヴィトロネクチン、トロンプ  
スポンジン等に由来する配列などが報告されている。し  
かしながら、上述の細菌のコラゲナーゼまたはフォンビ  
ルブランド因子由来のコラーゲン結合性ポリペプチドを  
選択した試みも含め本発明と同等の機能を持ったハイブ  
リッドポリペプチドは報告されていない。

【0056】本発明では、ヒト・FNのCys<sup>77</sup>からSer<sup>77</sup>  
までのアミノ酸配列で構成されるポリペプチド(特  
開昭62-89699号公報記載の配列)の全てを含んでいなく  
てもコラーゲン結合性血管新生調節因子のFN由来のポ  
リペプチドとして適切であるアミノ酸配列の例を挙げる  
ことができる。

【0057】具体的には、プラスミン、キモトリプシン  
とベプシンの限定分解で得られるヒト・FNのAla<sup>60</sup>から  
Leu<sup>76</sup>までのアミノ酸配列で構成されるポリペプチ  
ド、プラスミン、キモトリプシンとベプシンの限定分解  
で得られるヒト・FNのAla<sup>60</sup>からLeu<sup>83</sup>までのアミ  
ノ酸配列で構成されるポリペプチド、トリプシンの限定  
分解で得られるヒト・FNのAla<sup>60</sup>からArg<sup>84</sup>までのア  
ミノ酸配列で構成されるポリペプチド、プラスミン、キ  
モトリプシンとベプシンの限定分解で得られるヒト・F  
NのAla<sup>77</sup>からLeu<sup>83</sup>までのアミノ酸配列で構成される  
ポリペプチド、プラスミン、キモトリプシンとベプシン  
との限定分解で得られるヒト・FNのVal<sup>77</sup>からTrp<sup>83</sup>  
までのアミノ酸配列で構成されるポリペプチド、プラス  
ミン、キモトリプシンとベプシンの限定分解で得られ  
るヒト・FNのLeu<sup>83</sup>からTrp<sup>89</sup>までのアミノ酸配列で  
構成されるポリペプチド、トリプシンとキモトリプシン  
との限定分解で得られるヒト・FNのArg<sup>84</sup>からTrp<sup>89</sup>  
までのポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0058】またヒト・FNのCys<sup>77</sup>からSer<sup>77</sup>までの  
アミノ酸配列で構成されるポリペプチド配列の全てを含  
んでいてコラーゲン結合性血管新生調節因子のFN由来  
のポリペプチドとして適切であるポリペプチド配列の例  
を挙げることができ、具体的にプラスミンとキモトリブ  
シンの限定分解で得られるヒト・FNのAla<sup>60</sup>からTrp<sup>89</sup>  
までのポリペプチド、ズブチリシンとキモトリブシ  
ンの限定分解で得られるヒト・FNのVal<sup>62</sup>からTrp<sup>89</sup>  
までのポリペプチドのアミノ酸配列が挙げられる。

【0059】なおヒト・FNのCys<sup>77</sup>からSer<sup>77</sup>までの  
アミノ酸配列で構成されるポリペプチド配列の全てを含

んでいても、コラーゲン結合性血管新生調節因子のFN由来のポリペプチドとしては、不適切なポリペプチドの数は膨大であるが、たとえばヒト・FNのAsn<sup>220</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列

ヒト・FNのArg<sup>221</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのGly<sup>222</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのAsn<sup>223</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのLeu<sup>224</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのLeu<sup>225</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのGln<sup>226</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>227</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのIle<sup>228</sup>からSer<sup>277</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>229</sup>からCys<sup>230</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>231</sup>からThr<sup>232</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>233</sup>からPhe<sup>234</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>235</sup>からAsp<sup>236</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>237</sup>からAsn<sup>238</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>239</sup>からLeu<sup>240</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>241</sup>からSer<sup>242</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>243</sup>からPro<sup>244</sup>までのアミノ酸配列  
 ヒト・FNのCys<sup>245</sup>からGly<sup>246</sup>までのアミノ酸配列  
 などで構成されるポリペプチドが挙げられる。以上から、特開昭62-89699号公報にコラーゲン結合性部分として記載されたヒト・FNのCys<sup>277</sup>からSer<sup>277</sup>までのポリペプチドのアミノ酸配列の全てを含むか、含まないかは本発明のコラーゲン結合性血管新生調節因子のFN由来のポリペプチドのアミノ酸配列の選択には重要でない。  
 【0060】またFN由来のポリペプチドとして適切な場合あるいは不適切な場合のいずれもが、コラーゲン結合能を有する連続部分として同公報に記載されたThr<sup>279</sup>からVal<sup>444</sup>のアミノ酸配列を含んでおり、この連続部分が本発明のコラーゲン結合性血管新生調節因子のFN由来のポリペプチドとしての充分条件でもない。このThr<sup>279</sup>からVal<sup>444</sup>までを含むThr<sup>279</sup>からAla<sup>479</sup>までのアミノ酸配列で構成されるポリペプチドは単独でもコラーゲン結合能が無いことが他の論文(Skorstenqaardら)で報告されていることは前述したとおりである。

【0061】なお前述したように過去の他の研究では、コラーゲン結合性ポリペプチドと血管新生調節因子を含むハイブリッドポリペプチドにおいて、コラーゲン結合活性および血管新生調節活性の両方を維持することは困難であった。特にこれらハイブリッドポリペプチドは、コラーゲンに結合後、血管新生調節活性を示す事が実用上重要になるが、従来これを十分には達成できなかった。

【0062】＜血管新生調節因子＞本明細書で意味する血管新生調節因子とは、血管新生促進活性または血管新生阻害活性を有する血管新生促進因子または血管新生阻害因子の総称である。血管新生促進因子は、塩基性繊維芽細胞増殖因子及び酸性繊維芽細胞増殖因子などのFG

Fファミリー、血管内皮細胞増殖因子(VEGF110、121、165、189、206、-B、-C、-D)、IL-8、IL-4、PD-ECGF、HGF、アンジオジェニン、EGFファミリーに属する細胞成長因子(TGF- $\alpha$ 、ヘパリン結合性EGF様成長因子、EGF、アンフィレグリン、SDGF、ベータセルリン)、PDGF、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、アンジオポエチン-1、プレイオトロフィン、ミッドカイン、組織因子、TNF- $\alpha$ (低濃度)、IGF、CYR61、HGFのNK1ドメインおよびHGFのNK2ドメイン、エフリンB2、マトリックスメタロプロテナーゼ、G-CSF、成長ホルモンなどである。血管新生阻害因子は、エンドスタチン、アンジオスタチン、HGFのNK4、トロンボモジュリン、INF- $\alpha$ /INF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ (高濃度)、TGF- $\beta$ 、IL-1、IL-12、IP-10、GRO- $\beta$ 、PF-4、コンドロモジュリン、アンジオポエチン-2、TIMP-1、2、軟骨細胞由来抑制因子、プロトロンビン(クリングル2)などである。

【0063】血管新生調節因子として、特にPDGFスーパーファミリーに属する細胞成長因子が挙げられる。PDGFスーパーファミリーに属する細胞成長因子には、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)および結合組織成長因子(CTGF)がある。なおCTGFは、具体的にGrowth Factors, McKay and Leigh ed. IRL Press(1993)に記載されている。PDGFスーパーファミリーに属する細胞成長因子のうちでも、VEGFが好適である。

【0064】VEGFの活性にはダイマー(二量体)化が必要であるが、ホモダイマーは酸に安定であり、糖鎖を持つがレセプターへの結合や細胞増殖には影響しない。VEGFのレセプターは、flt-1とkdr/flk-1がコードするタンパク質である。VEGFには4つのアイソフォームが一般的には知られ、それぞれ、121(VEGF121)、165(VEGF165)、189(VEGF189)、206個(VEGF206)のアミノ酸配列からなり、VEGF165が最もよく研究されている。特にVEGF121およびVEGF165が好適である。

【0065】＜血管新生調節活性＞血管新生調節活性とは、内皮細胞の増殖、遊走、プラスミノーゲンアクチベータやコラゲナーゼなどのプロテアーゼ活性、血管様構造形成およびin vivoでの血管新生のいずれか一部、または全てを促進または阻害する活性を意味する。また本明細書において、血管新生調節活性とは、上述した血管新生調節因子由来の活性の一部または全てを意味し、本質的に、血管新生の正負の調節に関わり、局所保持またはターゲティングというデリバリーシステムの対象になるポリペプチドに対して血管新生調節因子と総称している。

【0066】＜ハイブリッドポリペプチド＞本発明におけるフィブロネクチンコラーゲン結合性ドメイン（FN CBD）と血管新生調節因子は、遺伝子工学的手法により、血管新生調節因子がFN CBDのカルボキシル末端側に連結されていることが望ましい。本発明のコラーゲン結合性血管新生調節因子は水溶性である。またバクテリア好ましくはE.coliで工業的に生産することができる。したがって血管新生調節因子が該フィブロネクチン由来のポリペプチドのカルボキシル末端に遺伝子工学的手法により連結され、バクテリア好ましくはE.coliで産生されることが望ましい。また酵母、昆虫細胞、動物細胞で産生することも可能である。

【0067】例えば、FNのコラーゲン結合性ドメインのカルボキシル末端側に血管新生調節因子を連結させ、血管新生調節因子のアミノ末端側にプロテアーゼ（例えばヒトの生体中に存在する）により切断され得る任意のアミノ酸配列を挿入し、余分な配列を付加せずに血管新生調節因子を遊離させることが可能である。詳しく説明すると、多くのプロテアーゼは認識配列のカルボキシル末端を切断するので、血管新生調節因子のアミノ末端にプロテアーゼ認識配列を付加すると、プロテアーゼによる切断後は血管新生調節因子のアミノ末端には余分なアミノ酸配列が残らないのである。このプロテアーゼの認識配列は新しく挿入するだけでなく、FNのコラーゲン結合性ドメインのC末端側がプロテアーゼ認識配列及び切断部位でもよい。従って、直接このカルボキシル末端に血管新生調節因子を連結すれば全く人工的な配列の挿入を含めないことも可能である。そして、この部位における切断後は、FNのコラーゲン結合性ドメイン及び血管新生調節因子の両者ともに余分なアミノ酸配列は残存しない。マトリクラインおよびジャクスタクライン活性という固相からレセプターに結合して、細胞に血管新生調節活性を及ぼす様式が可能な場合は、ハイブリッドポリペプチドのままでレセプターに結合し血管新生調節活性を示すことが可能かもしれない。一方、血管新生調節因子がFNのコラーゲン結合性ドメインから切断され、液相に遊離する必要がある場合、上記方法は重要である。

【0068】上記のようにFN CBDと血管新生調節因子とが連結された本発明のコラーゲン結合性血管新生調節因子は、コラーゲンに対する結合活性及び血管新生調節活性の両活性が維持されていることから、血管新生調節因子をコラーゲンマトリックス中に安定に保持させることが可能となり、血管新生調節活性を持続的に示すことができる。

【0069】上記において、血管新生調節因子と該フィブロネクチン由来のポリペプチドの連結部位にスペーサーとしてアミノ酸またはポリペプチドが挿入されていてもよい。この場合、該スペーサーと該スペーサー及びその隣接配列とのいずれかがプロテアーゼ認識配列を含む

ものが好ましい。プロテアーゼ認識配列はエンテロキナーゼ、血液凝固因子Xa、トロンピン、プレシジョン、カリクレイン、Genenase Iまたはレニンが好ましい。またプロテアーゼ認識配列はエンテロキナーゼの認識配列であることがさらに好ましい。

【0070】エンテロキナーゼ認識配列は、スペーサーとしてFN CBDとVEGF 121又はVEGF 165との間の距離の調整やエンテロキナーゼによりFN CBDからVEGF 121又はVEGF 165が遊離するための役割を果たす。エンテロキナーゼは高等動物の十二指腸粘膜、脾臓に存在するプロテアーゼである。従って、エンテロキナーゼ認識配列は十二指腸粘膜、脾臓でエンテロキナーゼにより認識、切断され、VEGF 121又はVEGF 165が遊離される。また、エンテロキナーゼはDDDDK（Asp-Asp-Asp-Asp-Lys）という非常に特異的な配列を認識してK（Lys）のC末端側を切断する酵素であり、コラーゲン結合性血管新生調節因子の血管新生調節活性を示すメカニズムを研究するために必要な配列である。

【0071】本発明のハイブリッドポリペプチドのコラーゲン結合活性またはコラーゲン結合性は、FN由来のポリペプチドに依存したコラーゲンに対する結合性であり、血管新生調節因子に依存したコラーゲンへの結合ではない。コラーゲン結合活性がFNに由来するかまたは血管新生調節因子に由来するのかは天然のFNまたは血管新生調節因子を用いた競合阻害実験で確認可能である。

【0072】本明細書で意味するコラーゲンまたはコラーゲン由来のポリペプチドは、天然コラーゲン、未成熟コラーゲン、アテロコラーゲン、またはゼラチン或いはそれらを構成するポリペプチドである。

【0073】本発明のハイブリッドポリペプチドの用途として、上記コラーゲン結合性血管新生調節因子を含む血管新生調節因子の局所維持剤、徐放剤、または血管新生調節活性付与剤が提供される。またコラーゲンの分解によるかまたは血管新生調節因子とFN由来のポリペプチドとの連結部位またはその近傍におけるプロテアーゼによる切断によって血管新生調節因子が徐放され、血管新生調節活性がコントロールされるバイオマテリアルが提供される。上記バイオマテリアルを用いて血管新生調節活性を介した細胞、組織、臓器に、増殖、分化、再生または物質産生を促進または阻害する方法を提供することができる。

【0074】従って、例えば、閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞または狭心症に対して効果的な血管新生療法または再狭窄防止を発揮させるためのVEGFなどの血管新生促進因子の徐放性、局所保持またはターゲティングを狙ったコラーゲン結合性血管新生調節因子及び血管新生調節因子複合化コラーゲンマトリックスが提供される。心臓や下肢など生体組織は多くの割合でコラーゲンから構

10

20

30

40

50

成されていて、あらゆる部位でコラーゲンは存在しているため、血管新生調節因子にコラーゲン結合性が備わっていれば、投与した部位またはその近傍のコラーゲンに結合し、局所濃度を高く維持し、有効性が高まる。それと同時に他部位へ拡散して生じる副作用を防ぐことになる。

【0075】また本発明では、上記コラーゲン結合性血管新生調節因子（ハイブリッドポリペプチド）を用いた細胞増殖方法が提供される。すなわち本発明の血管新生調節因子が細胞増殖因子であるハイブリッドポリペプチドは、そのコラーゲン／ゼラチン結合性を利用してコラーゲン／ゼラチンマトリックスに固定することができ、細胞増殖因子は灌流される培養液で流出しないため、容易に細胞増殖を行うことができる。

【0076】本発明は、血管新生療法や再狭窄防止を目的とするVEGFの例に限られず、血管新生調節活性を持つ多くのポリペプチドに適用可能である。即ち、本発明により、さまざまな血管新生調節因子の血管新生調節活性が維持され、かつコラーゲンに対する結合活性が付与されることで血管新生調節因子の徐放性、局所保持またはターゲティングを狙ったコラーゲン結合性血管新生調節因子が提供される。

【0077】また上記コラーゲン結合性血管新生調節因子をコードする遺伝子、および該遺伝子を含有する組換えベクター、該遺伝子を含有する形質転換体（動物細胞、昆虫細胞、酵母、細菌）、または該遺伝子を含有するバクテリア好ましくはE. coli も提供される。さらに、該コラーゲン結合性血管新生調節因子をコードする遺伝子をレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ベクター等のウイルスベクターまたはリボソーム法を用いたベクターに組み込むことで遺伝子治療用ベクターが提供され、さらに該ベクターが導入されることで該ポリペプチドまたは該遺伝子を含む細胞医薬が提供される。

【0078】該ポリペプチドをコラーゲンと複合化させることと血管新生調節因子複合化コラーゲンマトリックスが提供され、医療分野で利用される新規な組織再生のバイオマテリアルとして有用である。すなわち本発明は、人工組織、人工器官（血管、神経、耳、鼻、指、皮膚、十二指腸などの腸管、胃、心臓、肝臓、脾臓、腎臓など）を構築させるための足場と血管新生調節活性を兼ね備えた血管新生調節因子複合化コラーゲンを含むバイオマテリアルを提供する。

【0079】以下に本発明の実施態様例について、より詳細に説明する。ヒトFNのcDNA及びタンパク質の一次構造は、各々 EMBL データバンク (EMBL DATA BANK) 及びThe EMBO Journal、第4巻、第7号、1755-1759頁 (1985) に記載されている。

【0080】まず、ヒトFNをプロテアーゼ（プラスミンとキモトリプシン）で限定分解して得られるコラーゲ

ン／ゼラチン結合性ドメインのアミノ酸配列に相当する配列をクローニングする。ヒトの細胞から抽出されたmRNAを用いて逆転写反応を行い、得られたcDNAから、PCR法 (Polymerase Chain Reaction : Saiki ら、Science、第230巻、1350~1354頁 (1985)) によりヒトFNのコラーゲン結合性ドメイン (FN CBD) に対応するcDNA部分が増幅される。この際、PCRに用いられるセンスプライマーには5'末端に制限酵素認識配列と開始コドン配列が、またアンチセンスプライマーには5'末端に制限酵素認識配列と終始コドンが付加されている。

【0081】そして、FN CBDのcDNA断片がクローニングベクターpBlueScript SKに挿入され、プラスミドpBS(FN CBD) が構築される。塩基配列確認後、このcDNA断片が切り出され発現ベクター pTYB1に組み込まれてプラスミドpTYB1(FN CBD) が構築される。pTYB1(FN CBD) は、ヒトFNのAla<sup>260</sup>-Trp<sup>399</sup> (340アミノ酸残基) を発現するプラスミドであり、大腸菌に導入されることによりコラーゲン結合性ポリペプチドが調製される。

【0082】本発明で必要とされるFN CBDのcDNAとしては、プラスミドpBS(FN CBD) 由来のcDNA断片が用いられるが、PCRプライマーの設計により、cDNA断片の5'末端には開始コドン配列が付加されており、FN CBD翻訳領域のC末端に付加された終止コドン直前にクローニングサイト、例えばXho Iの認識配列が導入されている。これにより、FN CBDのcDNAと血管新生調節因子のcDNAを連結させることが可能である。

【0083】本発明のポリペプチドは、FN CBDのcDNAと血管新生調節因子のcDNAを連結し、遺伝子工学的に発現させて調製される。本発明による機能性ポリペプチドは、例えば、ヒトFNをプロテアーゼ（プラスミンとキモトリプシン）で限定分解したときに得られる配列表配列番号4で表されるAla<sup>260</sup>-Trp<sup>399</sup>に相当する340アミノ酸残基のポリペプチドを、配列表配列番号8あるいは配列番号12で表されるヒトVEGF 121あるいはヒトVEGF 165に各々結合させた人工の機能性ポリペプチドである。即ち、該ポリペプチドはFN CBDのcDNAにVEGF 121またはヒトVEGF 165のcDNAが連結され、遺伝子工学的に調製される。

【0084】配列表配列番号4のアミノ酸番号1はヒトFN CBDを遺伝子工学的に発現させるための開始コドンに対応するMet、アミノ酸番号2~341はヒトFN CBDのアミノ酸配列、アミノ酸番号342~343は血管新生調節因子のcDNAと連結するためのXho I認識配列由来のアミノ酸Leu及びGluである。但し、ハイブリッドポリペプチドではXho I認識配列とSal I認識配列の連結によりGluは除かれる。

【0085】配列表配列番号8のアミノ酸番号1はFNCBDのcDNAとの連結するためのSalI認識配列由来のAsp、アミノ酸番号1～5はエンテロキナーゼの認識配列(Asp-Asp-Asp-Asp-Lys;DDDDK)、アミノ酸番号6～126はヒトVEGF121のアミノ酸配列である。

【0086】配列表配列番号12のアミノ酸番号1はFNCBDのcDNAと連結するためのSalI認識配列由来のAsp、アミノ酸番号1～5はエンテロキナーゼの認識配列(DDDDK)、アミノ酸番号6～170はヒトVEGF165のアミノ酸配列である。

【0087】なお、ヒトFNのアミノ酸に付された肩数字はEMBLデータベース(EMBL DATABANK)中の成熟型ヒトFNのN末端から数えたアミノ酸残基数を示す。また、配列表配列番号4で表されるヒトFNのAla<sup>260</sup>-Trp<sup>299</sup>に相当する340アミノ酸残基のポリペプチドは、EMBL DATABANK中のアミノ酸配列と2アミノ酸残基異なり、人工的変異ではない。

【0088】ヒトVEGF121のcDNA及びタンパク質の一次構造は、Weindelら、(Biochemical and Biophysical Research communications、第183巻、第3号、1167-1174頁(1992))に記載されている。また、ヒトVEGF165のcDNA及びタンパク質の一次構造は、Leungら(Science、第246巻、1306-1309頁(1989))に記載されている。

【0089】本発明では、ヒトのmRNAを用いて調製したcDNAから、PCR法によりヒトVEGF121及びヒトVEGF165のcDNAが増幅される。それぞれのPCRには5'末端に制限酵素認識配列とプロテアーゼ認識配列をコードする塩基配列が付加されたセンスプライマーと5'末端に制限酵素認識配列が付加されたアンチセンスプライマーを用いた。次に、これらcDNA断片をpBluescriptSKに挿入して、pBS(VEGF121)ベクター及びpBS(VEGF165)ベクターが作成される。

【0090】前記したヒトFNCBDのcDNAをプラスミドpBS(VEGF121)あるいはpBS(VEGF165)のヒトVEGF121あるいはヒトVEGF165の5'末端制限酵素認識配列に結合し、ヒトFNCBDのC末端にヒトVEGF121またはヒトVEGF165の各々が連結しているcDNAを有するプラスミドpBS(FNCBD-VEGF121)あるいはpBS(FNCBD-VEGF165)が得られる。これらのプラスミドから切り出された融合遺伝子断片を発現ベクターpTYB1に挿入し、配列表配列番号14または配列番号16で表されるポリペプチドを発現する組換え体プラスミドpTYB1(FNCBD-VEGF121)またはpTYB1(FNCBD-VEGF165)が得られる。

【0091】FNCBDのcDNAとVEGF121またはVEGF165のcDNAとの連結部位にはPCR

プライマー由来の塩基配列が挿入されており、エンテロキナーゼ認識配列などをスパーサーペプチドとして発現させることにより、FNCBDに対するVEGF121またはヒトVEGF165の分子間距離の調整および/またはプロテアーゼ認識配列の挿入が可能である。スパーサー中のプロテアーゼ認識配列の有無、種類、ペプチドの配列、長さは目的に応じて選択する。

【0092】配列表配列番号14はヒトFNCBDとヒトVEGF121のハイブリッドポリペプチドであり、アミノ酸番号1は開始コドンに対応するMet、アミノ酸番号2～341はヒトFNCBDのアミノ酸配列、アミノ酸番号342～343はヒトFNCBDのcDNAとVEGF121のcDNAとの連結(XhoI認識配列とSalI認識配列のライゲーション)により生じる塩基配列がコードするLeu及びAsp、アミノ酸番号343～347はエンテロキナーゼの認識配列Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(DDDDK)、アミノ酸番号348～468はヒトVEGF121のアミノ酸配列である。ただし、アミノ酸番号1の開始コドンに対応するMetは、翻訳後、除かれる場合と除かれない場合がある。

【0093】配列表配列番号16はヒトFNCBDとヒトVEGF165のハイブリッドポリペプチドであり、アミノ酸番号1は開始コドンに対応するMet、アミノ酸番号2～341はヒトFNCBDのアミノ酸配列、アミノ酸番号342～343はヒトFNCBDのcDNAとヒトVEGF165のcDNAとの連結(XhoIとSalIサイトのライゲーション)により生じる塩基配列がコードするLeu及びAsp、アミノ酸番号343～347はエンテロキナーゼ認識配列(DDDDK)、アミノ酸番号348～512はヒトVEGF165のアミノ酸配列である。ただし、アミノ酸番号1の開始コドンに対応するMetは、翻訳後、除かれる場合と除かれない場合がある。

【0094】上記の様に構築されたプラスミドpTYB1(FNCBD)、pTYB1(FNCBD-VEGF121)及びpTYB1(FNCBD-VEGF165)は各々大腸菌に導入され、適当な条件下で培養されることにより、目的ポリペプチドが大腸菌内に蓄積される。発現の確認にはイムノブロットングが用いられる。即ち、組換え大腸菌の全菌体タンパク質がSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離され、ニトロセルロース膜転写後、FNCBD、VEGF121及びヒトVEGF165の各々を認識するモノクローナル抗体で目的ポリペプチドのバンドが検出される。

【0095】本発明のポリペプチドは、例えば次のように調製される。プラスミドが導入された組換え大腸菌はSBプロス等の培地で培養され、IPTG(イソプロピル-β-D-ガラクトシド)が添加される。これによって導入された遺伝子の発現が誘導され、さらに培養してから菌体が回収される。集められた菌体は超音波処理によって破碎される。そして、菌体破碎液から遠心分離して

回収される沈殿に目的ポリペプチドは封入体として得られ、8M尿素により変性可溶化される。

【0096】次いで、尿素濃度を段階的に低下させながら透析して、目的タンパク質が再活性化される（リフォールディング処理）。以上のように調製される40kDa、53.5kDa及び58.5kDaのポリペプチドは各々、FNCBD、FNCBDとVEGF121とのハイブリッドポリペプチド（FNCBD-VEGF121）及びFNCBDとヒトVEGF165とのハイブリッドポリペプチド（FNCBD-VEGF165）である。

【0097】

【実施例】以下、本発明の実現性を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

（実施例1）ヒトFNCBDとヒトVEGF121とのハイブリッドポリペプチド、及びヒトFNCBDとヒトVEGF165とのハイブリッドポリペプチドの調製

（a）ヒトFNCBDをコードするcDNAのクローニング

ヒト腎臓の細胞から抽出したmRNAをテンプレートとしてプライマー（2）を用いてcDNAに逆転写し、プライマー（1）及び（2）の1組のプライマーを用いて、プラスミンとキモトリプシンで限定分解したときの配列に相当するヒトFNCBDのcDNAをPCR増幅させた（RT-PCR）。

【0098】配列表配列番号1で表されるプライマー

（1）の塩基番号1～2は、PCR後のKpnI消化に備えた隣接付加配列、塩基番号3～8は、クローニング用のKpnI認識配列、塩基番号7～12は、NcoI認識配列、塩基番号13～14は、発現フレーム合わせの配列、塩基番号15～20は、NdeI認識配列、塩基番号18～20は、ヒトFNCBDを発現させるための開始コドン配列、塩基番号21～49は、ヒトFNCBDの塩基配列である。

【0099】また、配列表配列番号2で表されるプライマー（2）の塩基番号1～2は、PCR後のBamHI消化に備えた隣接付加配列、塩基番号3～8は、クローニング用のBamHI認識配列、塩基番号9～11は、終止コドンのアンチセンス配列、塩基番号12～17は、VEGF121またはヒトVEGF165などの血管新生調節因子のcDNAと連結させるためのXhoI認識配列、塩基番号18～46は、ヒトFNCBDのcDNAのアンチセンス配列である。

【0100】RT-PCRは、RNA LAPCR Kit (AMV) Ver.1.1（宝酒造）を用いて、まずトータルRNA 0.8μgを20μlの反応液量で60℃で20分間逆転写し、さらに99℃で5分間加熱した。得られたcDNAをテンプレートとしたPCR反応は、100μlの反応液量で、94℃で1分間保持した後、94℃で30秒間→63℃で1分間→72℃で2分間の温度サイクルを12回繰り返した。反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動

で解析した結果、約1kbpのDNA断片が認められた。これは、ヒトFNCBDのcDNAに相当するサイズであった。

【0101】この増幅されたcDNA断片をKpnI及びBamHIで消化後、KpnI及びBamHIで消化したクローニングベクターpBluescriptSKに、25℃で3分間、ライゲーションした（宝酒造製ライゲーションキットVer.2を使用）。

【0102】塩基配列解析の結果、配列表配列番号3で表されるcDNAが組み込まれたプラスミド得られ、これをpBS（FNCBD）と命名した。配列表配列番号3の塩基番号1～6は、クローニング用のKpnI認識配列、塩基番号5～10は、NcoI認識配列、塩基番号11～12は、フレーム合わせの配列、塩基番号13～18は、NdeI認識配列、塩基番号16～18は、ヒトFNCBDを発現させるための開始コドン配列、塩基番号19～1038は、ヒトFNCBDのcDNAの塩基配列、塩基番号1039～1044は、VEGF121またはヒトVEGF165などの血管新生調節因子のcDNAと連結させるためのXhoI認識配列、塩基番号1045～1047は、終止コドン、塩基番号1048～1053は、クローニング用のBamHI認識配列である。なおFNCBDのcDNA配列は、EMBLデータバンク（EMBL DATA BANK）に登録された配列と5塩基異なっていたが、この相違はPCRによる点変異に起因しないことは確認している。

【0103】（b）ヒトVEGF121をコードするcDNAのクローニング

ヒト細胞より抽出したmRNAをテンプレートとしてプライマー（4）を用いてcDNAに逆転写し、プライマー（3）及び（4）の1組のプライマーを用いてヒトVEGF121のcDNAをPCR増幅させた。配列表配列番号5で表されるプライマー（3）の塩基番号1～2はPCR後のSalI消化に備えた隣接付加配列、塩基番号3～8はクローニング用及びFNCBDのcDNAとの連結用SalI認識配列、塩基番号6～20はエンテロキナーゼの認識配列（DDDDK）をコードした塩基配列、塩基番号21～44はヒトVEGF121のcDNAの塩基配列である。

【0104】また配列表配列番号6で表されるプライマー（4）の塩基番号1は、PCR後のEcoRI消化に備えた隣接付加配列、塩基番号2～7は、クローニング用のEcoRI認識配列、塩基番号8～10は、終止コドンのアンチセンス配列、塩基番号11～31は、ヒトVEGF121のcDNAのアンチセンス配列である。

【0105】RT-PCRはRNA LAPCR Kit (AMV) Ver.1.1（宝酒造）を用い、まずテンプレートのトータルRNA 1.0μgを反応液量20μlで、60℃で20分間逆転写し、さらに99℃で5分間加熱した。PCR反応は、cDNAを加えた100μlの反応液で、94℃で2分間保持した後、94℃で30秒間→65℃で4分間



の温度サイクルを30回行った。反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動で解析した結果、約390bpのDNA断片が認められた。これはヒトVEGF121に相当するサイズであった。

【0106】このcDNA断片をSalI及びEcoRIで消化後、SalI及びEcoRIで消化したpBluescriptSKにライゲーションした。そして配列表配列番号7で表されるcDNAが組み込まれたプラスミドを得てpBS(VEGF121)と命名した。配列表配列番号7の塩基番号1~6は、クローニング用及びFN CBDのcDNAとの連結用SalI認識配列、塩基番号4~18はエンテロキナーゼの認識配列(DDDDK)をコードする塩基配列、塩基番号19~381はヒトVEGF121のcDNAの塩基配列、塩基番号382~384は終止コドン、塩基番号385~390はクローニング用のEcoRI認識配列である。

【0107】(c)ヒトVEGF165をコードするcDNAのクローニング

ヒト細胞より抽出したmRNAをテンプレートとしてプライマー(6)を用いてcDNAに逆転写し、プライマー(5)及び(6)の1組のプライマーを用いてヒトVEGF165のcDNAをPCR増幅させた。配列表配列番号9で表されるプライマー(5)の塩基番号1~2はPCR後のSalI消化に備えた隣接付加配列、塩基番号3~8はクローニング用及びFN CBDのcDNAとの連結用SalI認識配列、塩基番号6~20はエンテロキナーゼの認識配列(DDDDK)をコードした塩基配列、塩基番号21~44はヒトVEGF165のcDNAの塩基配列である。

【0108】また、配列表配列番号10で表されるプライマー(6)の塩基番号1はPCR後のEcoRI消化に備えた隣接付加配列、塩基番号2~7はクローニング用のEcoRI認識配列、塩基番号8~10は終止コドンのアンチセンス配列、塩基番号11~31は、ヒトVEGF165のcDNAのアンチセンス配列である。

【0109】RT-PCRは、Takara RNA LA PCR TM Kit (AMV) Ver.1.1(宝酒造)を用い、まずテンプレートのトータルRNA 1.0μgを反応液量20μlで、60℃で30分間逆転写反応させ、99℃で5分間加熱した。PCR反応は、反応液量100μlで94℃で1分間保持した後、94℃で30秒間→65℃で45秒間の温度サイクルを30回行った。

【0110】反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動で解析した結果、約520bpのDNA断片が認められた。これは、ヒトVEGF165に相当するサイズであった。このDNA断片をSalI及びEcoRIで消化後、SalI及びEcoRIで消化したpBluescriptSKにライゲーションした。そして、配列表配列番号11で表されるcDNAが組み込まれたプラスミドが得られ、pBS(VEGF165)と命名した。

【0111】配列表配列番号11の塩基番号1~6はクローニング用及びFN CBDのcDNAとの連結用SalI認識配列、塩基番号4~18はエンテロキナーゼの認識配列(DDDDK)をコードした塩基配列、塩基番号19~513はヒトVEGF165のcDNAの塩基配列、塩基番号514~516は終止コドン配列、塩基番号517~522はクローニング用のEcoRI認識配列である。

【0112】(d)ヒトFN CBD発現ベクターの調製  
上記(a)で得られたプラスミドpBS(FN CBD)を、NdeI及びNotI(NotI認識配列はpBluescriptSKのマルチクローニングサイトに存在)で処理した。挿入されていたFN CBDのcDNA断片を切り出し、発現ベクターであるpTYB1(Nov England Biolab)のNdeI-NotIサイトにライゲーションした。構築されたプラスミドをpTYB(FN CBD)と命名した。

【0113】(e)FN CBDとVEGF121とのハイブリッドポリペプチド発現ベクターの調製

上記(a)で得られたプラスミドpBS(FN CBD)はKpnI及びXhoIで消化された。なお、EMBL DATA BANKに登録されたFN CBD配列にはXhoI認識配列は存在しないがヒトのメサンギウム細胞RNAからRT-PCRで得られたFN CBDのcDNA配列中にはXhoI認識配列が存在したので部分消化した。

【0114】この処理により挿入されていたFN CBDのcDNA断片が切り出され、上記(b)で得られたプラスミドpBS(VEGF121)のKpnI-SalIサイトにライゲーションされた。このように構築されたプラスミドには、配列表配列番号13で表されるDNAが組み込まれており、このプラスミドをpBS(FN CBD-VEGF121)と命名した。

【0115】配列表配列番号13の塩基番号1~6はクローニング用KpnI認識配列、塩基番号5~10はNcoI認識配列、塩基番号11~12はフレーム合わせの配列、塩基番号13~18はNdeI認識配列、塩基番号16~18は開始コドン配列、塩基番号19~1038はヒトFN CBDのcDNA配列、塩基番号1039~1044はXhoI認識配列とSalI認識配列のライゲーションによって生じた塩基配列、塩基番号1042~1056はエンテロキナーゼの認識配列(DDDDK)をコードする塩基配列、塩基番号1057~1419はヒトVEGF121のcDNA配列、塩基番号1420~1422は終止コドン、塩基番号1423~1428はクローニング用のEcoRI認識配列である。

【0116】pBS(FN CBD-VEGF121)に挿入されていた融合遺伝子のDNA断片がNdeIとEcoRIで切り出され、この断片は発現ベクターであるpTYB1のNdeI-EcoRIサイトにライゲーションされた。このように構築されたプラスミドをpTYB1(FN CBD-VEGF121)と命名した。

【0117】(f)FN CBDとヒトVEGF165と

10

20

30

40

50



のハイブリッドポリペプチド発現ベクターの調製  
上記(a)で得られたプラスミドpBS(FNCBD)から、KpnI及びXhoI(部分消化)処理で、挿入されていたFNCBDのDNA断片が切り出され、上記(c)で得られたプラスミドpBS(ヒトVEGF165)のKpnI-SalIサイトにライゲーションされた。このように構築されたプラスミドには配列表配列番号15で表されるDNAが組み込まれており、このプラスミドをpBS(FNCBD-VEGF165)と命名した。

【0118】配列表配列番号15の塩基番号1~6はクローニング用のKpnI認識配列、塩基番号5~10はNcoI認識配列、塩基番号11~12はフレーム合わせの配列、塩基番号13~18はNdeI認識配列、塩基番号16~18は開始コドン配列、塩基番号19~1038はヒトFNCBDのcDNA配列、塩基番号1039~1044はXhoI認識配列とSalI認識配列のライゲーションによって生じた塩基配列、塩基番号1042~1056はエンテロキナーゼの認識配列(DDDDK)をコードする塩基配列、塩基番号1057~1551はヒトVEGF165のcDNA配列、塩基番号1552~1554は終止コドン、塩基番号1555~1560はクローニング用のEcoRI認識配列である。

【0119】pBS(FNCBD-VEGF165)に挿入されていた融合遺伝子のDNA断片がNdeIとEcoRIで切り出され、発現ベクターであるpTYB1のNdeI-EcoRIサイトにライゲーションされた。このように構築されたプラスミドをpTYB1(FNCBD-ヒトVEGF165)と命名した。

【0120】(g) FNCBDとVEGF121とのハイブリッドポリペプチド及びFNCBDとVEGF165とのハイブリッドポリペプチドの発現の確認  
pTYB1(FNCBD)、pTYB1(FNCBD-VEGF121)及びpTYB1(FNCBD-VEGF165)で大腸菌株ER2566(New England BioLabs)を各々形質転換した。形質転換された大腸菌は、100µg/mlのアンピシリンを含むLB培地2mlで、一夜37℃で培養された。この前培養液0.02mlを100µg/mlのアンピシリンを含むSB培地2mlに接種した。菌濁度が0.5になるまで培養後、1mMになるようにIPTG(イソプロピル-β-D-ガラクトシド)を添加し、さらに37℃で2時間培養後集菌した。

【0121】全菌体タンパク質をSDS-PAGE(12%ゲル)で展開した後、クマシー染色を行った。その結果、染色ゲルにおいて、FNCBD、FNCBDとVEGF121とのハイブリッドポリペプチド及びFNCBDとVEGF165とのハイブリッドポリペプチドそれぞれの分子量に相当する40kDa、53.5kDa及び58.5kDaに各々のバンドが観察され、組換えポリペプチドの発現が確認された。

【0122】別に、SDS-PAGE後のゲルをニトロ

セルロース膜に転写し、FNCBDを特異的に認識するモノクローナル抗体(FNC4-4、宝酒造)、VEGF121及びヒトVEGF165を特異的に認識するモノクローナル抗体を作用させた。

【0123】その結果、40kDaのポリペプチドには抗ヒトFNCBDモノクローナル抗体が反応し、53.5kDaのポリペプチドには抗ヒトFNCBDモノクローナル抗体及び抗ヒトVEGFモノクローナル抗体が反応し、58.5kDaのポリペプチドには抗ヒトFNCBDモノクローナル抗体及び抗ヒトVEGFモノクローナル抗体が反応することが確認された。従って、40kDaのポリペプチドはヒトのFNCBD、53.5kDaのポリペプチドはヒトFNCBDとヒトVEGF121とのハイブリッドポリペプチド(FNCBD-VEGF121)、そして58.5kDaのポリペプチドはヒトFNCBDとヒトVEGF165とのハイブリッドポリペプチド(FNCBD-VEGF165)と考えられる。

【0124】以上のようにプラスミドpTYB1(FNCBD)、pTYB1(FNCBD-VEGF121)及びpTYB1(FNCBD-VEGF165)で形質転換され、各々のポリペプチドの発現が確認された大腸菌ER2566(New England BioLabs)を、各々、ER2566[pTYB1(FNCBD)]、ER2566[pTYB1(FNCBD-VEGF121)]、ER2566[pTYB1(FNCBD-VEGF165)]と命名した。

【0125】(h) 発現ポリペプチドの調製  
上記(g)で得られた大腸菌を100µg/mlのアンピシリンを含むLB培地2mlで一夜37℃で前培養した。この前培養液0.2mlを100µg/mlのアンピシリンを含むSB培地2mlに接種した。濁度2~5でIPTGを終濃度10µMになるように添加し、さらに37℃で16時間培養した後、集菌した。

【0126】得られた菌体は2mlの超音波処理用緩衝液[50mMトリス(Tris)-塩酸緩衝液pH8.0、50mM塩化ナトリウム、1mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)]で洗浄後、遠心分離して再び同緩衝液2mlに懸濁し、超音波の15秒処理・15秒休止を氷冷で6回繰り返して菌体を破碎した。

【0127】この懸濁液に終濃度1%になるようにトライトンX-100(TritonX-100)を添加し、4℃、5,000回転/分で20分間遠心分離した。得られた沈査をさらに封入体洗浄液[0.5%TritonX-100、1mMEDTA]で3回洗浄した。遠心分離後、不溶画分を8M尿素溶液[8M尿素、50mMTris-塩酸緩衝液pH8.0、1mMEDTA]中に1時間室温で静置して溶解した。次にこの溶解液を4℃、14,000回転/分で20分間遠心分離し、上清を回収した。

【0128】上清は、4M尿素溶液、2M尿素溶液に対して順次透析され、最後にゼラチン結合活性実験用として超音波処理用緩衝液に対して透析された。

【0129】透析後、4℃、14,000回転/分で20分間遠心分離し、上清を可溶性組換えタンパク質サンプルとした。得られたサンプルはSDS-PAGEにより、アミノ酸配列から算出される40kDa、53.5kDa及び58.5kDaの位置に各々のバンドが検出され、組換えタンパク質であるポリペプチドが確認された。

#### 【0130】(実施例2)

<コラーゲン結合性の検討>実施例1で得られたFNCBD-VEGF121及びFNCBD-VEGF165を用いてコラーゲン結合活性を調べた。

##### (1) バッチ法

FNCBD-VEGF121及びFNCBD-VEGF165のゼラチン(ゼラチンセファロース4B、アマシヤムファルマシアバイオテク)に対する結合活性はバッチ法によって調べた。組換えタンパク質サンプルとしては、超音波処理用緩衝液に透析された約50μg/mlのFNCBD-VEGF121及びFNCBD-VEGF165を用いた。1.5mlのマイクロチューブに500μlのFNCBD-VEGF121またはFNCBD-VEGF165と500μlのゼラチンセファロース4B(超音波処理用緩衝液で2回洗浄後、50%(容積/容積)混濁液とした)を加え、4℃で1時間回転器で混合した。5000回転/分で30秒遠心後、その上清を回収した。次に沈査に超音波処理用緩衝液500μlを加え4℃で1時間、回転器で混濁後、5,000回転/分で30秒遠心し、その上清を回収した。同様に、トリス緩衝生理的食塩水、1M塩化ナトリウム溶液、2M塩化ナトリウム溶液で沈査を洗浄した。次に同様の操作で1M尿素、2M尿素、4M尿素、8M尿素溶液で順次ゼラチンセファロース4Bに結合しているタンパク質の溶出を試みた。最後に、500μlのSDSバッファー中で90℃に加熱してゼラチンセファロース4Bに結合しているタンパク質を溶出させた。

【0131】クマシー染色後のゲルでは、ゼラチンとの反応後の上清をアブライしたレーンにアミノ酸配列から計算される53.5kDaまたは58.5kDaの付近にFNCBD-VEGF121またはFNCBD-VEGF165のバンドが検出されず、FNCBD-VEGF121、FNCBD-VEGF165のゼラチンへの結合が明らかになった。次いで、超音波処理用緩衝液、トリス緩衝生理的食塩水、1M塩化ナトリウム溶液及び2M塩化ナトリウム溶液による洗浄によってもバンドは検出されず、これら溶液の洗浄では、FNCBD-VEGF121、FNCBD-VEGF165はゼラチンから溶出しないことが明らかとなった。同様の操作で1M尿素、2M尿素、4M尿素、8M尿素で溶出を試みた結果、1M尿素、2M尿素では、ほとんどバンドは検出されず、4M尿素、8M尿素で各々53.5kDaまたは58.5kDaのバンドが検出された。90℃のSDSバッファーによる溶出でも、FNCBD-VEGF121、F

NCBD-VEGF165のバンドは検出された

【0132】即ち、1M尿素、2M尿素では、FNCBD-VEGF121及びFNCBD-VEGF165はゼラチンからほとんど溶出されず、4M尿素、8M尿素、90℃のSDSバッファーによって殆どが溶出されることから、FNCBD-VEGF121及びFNCBD-VEGF165のゼラチンに対する強固な結合が裏付けられた。同様の実験結果はゼラチンの代わりにコラーゲンスポンジを用いた場合にも得られた。以降の実験は、ゼラチンセファロース4Bで精製後、リン酸緩衝液で透析されたポリペプチドサンプルが使用された。

##### 【0133】(2) ELISA法

酵素結合免疫評価法(ELISA法)では、ウシ天然コラーゲン(1-AC、高研)、ウシアテロコラーゲン(1-PC、高研)及びウシ血清アルブミン(BSA、シグマ)に対するFNCBD-VEGF121及びFNCBD-VEGF165の結合活性を調べた。

【0134】最初に、ELISA用平底の96ウェル(well)マルチプレートに各々1mg/mlの天然コラーゲン、アテロコラーゲン、血清アルブミン溶液を200μl/ウェルで分注し、4℃で一夜静置した。

【0135】0.05% Tween 20のリン酸緩衝化生理的食塩水溶液でウェルを6回洗浄後、リン酸緩衝化生理的食塩水で希釈したFNCBD-VEGF121及びFNCBD-ヒトVEGF165溶液を100μl、各々のウェルに分注し、37℃で1時間、静置した。

【0136】Tween 20を0.05%含むリン酸緩衝化生理的食塩水溶液で3回洗浄後、1000分の1に希釈された抗ヒトFNCBDモノクローナル抗体(宝酒造)を100μl分注し、室温で1時間静置した。0.05% Tween 20/リン酸緩衝化生理的食塩水溶液でウェルを3回洗浄後、1000倍希釈のペロキシダーゼ標識抗マウスIgGグロブリンポリクローナル抗体(ダコジャパン)を100μlウェルに分注し、室温で1時間静置した。0.05% Tween20/リン酸緩衝化生理的食塩水溶液でウェルを6回洗浄後、1mg/ml オルト-フェニレンジアミン(o-phenylenediamine)と0.03%過酸化水素を含む0.1Mクエン酸緩衝液pH4.7を分注し、10分静置後、4規定硫酸50μlで反応を停止し、492nm-690nmの吸光度を測定した。

【0137】FNCBD-VEGF121およびFNCBD-VEGF165を、天然コラーゲン、アテロコラーゲン、血清アルブミンに反応させた結果、天然コラーゲン、アテロコラーゲンの場合の吸光度は、血清アルブミンを用いた場合の吸光度より明らかに高かった。このように、FNCBD-VEGF121およびFNCBD-VEGF165の天然コラーゲン、アテロコラーゲンに対する結合度は、血清アルブミンに対する結合度に比べて顕著に高い値を示した。

【0138】ELISA法における吸光度は、結合活性

10

20

30

40

50

に相関して高くなると考えられるが、非特異的な結合と見なせる固相化血清アルブミンとの反応に比べ、FNCBD-VEGF121及びFNCBD-VEGF165と固相化天然コラーゲン、アテロコラーゲンとの反応では明らかに高い吸光度を示すことから、これらの反応は特異的な結合反応と考えられる。このことは、本発明で遺伝子工学的に産生されたポリペプチドが、FNCBDが本来持っているコラーゲン結合活性を消失することなく血管新生調節因子がハイブリッド化された分子であることを示す。すなわち、ハイブリッドポリペプチドとしたことにより、血管新生調節因子にフィブロネクチン由来のコラーゲン結合活性の付与が可能であった。

#### 【0139】(実施例3)

<血管内皮細胞増殖活性>上記実施例2でコラーゲン結合活性を示したFNCBD、FNCBD-VEGF121及びFNCBD-VEGF165について、それらが細胞増殖活性を維持しているかどうかを検討した。

【0140】ヒト微小血管内皮細胞を、2%牛胎児血清を含む培地に懸濁し、24穴マイクロプレートに $1 \times 10^4$ 細胞/ウェルで分注後、5%二酸化炭素存在下、37℃で7時間培養した。次に、FNCBD、FNCBD-VEGF121、FNCBD-VEGF165の各々を培地中に添加し、37℃で4日間培養した。そして、細胞増殖活性の測定にはWST-1法を用いた。反応液を96穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーによって450nm-690nmの吸光度を測定し、細胞増殖活性を調べた。

【0141】FNCBDと比べて、明らかにFNCBD-VEGF121、FNCBD-VEGF165の各々は、ヒト微小血管内皮細胞に対して濃度依存的に細胞増殖活性を示した。従って、FNCBDをVEGF121またはVEGF165にハイブリッド化させることで、ヒトVEGF121およびVEGF165の内皮細胞増殖活性は消失しなかったと考えられる。

#### 【0142】(実施例4)

<コラーゲン結合後の血管内皮細胞増殖活性>コラーゲン結合性血管新生調節因子のコラーゲン結合後の血管内皮細胞増殖活性を調べた。コラーゲン結合活性及び内皮細胞増殖活性が確認されたコラーゲン結合性血管新生調節因子の例として、FNCBD-VEGF121、FNCBD-VEGF165の各々をコラーゲンに結合後(FNCBD-VEGF121、FNCBD-VEGF165各々の複合化コラーゲン)、その細胞増殖活性が調べられた。最初に、組織培養用24穴マイクロプレートに1mq/mlのアテロコラーゲン塩酸溶液(pH3.0)を500μl/ウェルで分注し、一夜、4℃で静置した。その溶液を捨て、0.05% Tween 20のリン酸緩衝化生理的食塩水溶液で4回洗浄し、続いてリン酸緩衝化生理的食塩水溶液で2回洗浄後、無血清DMEM培地で1回洗浄した。次に、無血清DMEM培地で連続希釈したFNCBD-

VEGF121、FNCBD-VEGF165またはFNCBD溶液を250μl、各々のウェルに分注し、37℃で2時間、静置した。溶液を捨て0.05% Tween 20のリン酸緩衝化生理的食塩水溶液で2回洗浄し、続いてリン酸緩衝化生理的食塩水溶液で6回洗浄後、ハンクス緩衝液で1回洗浄した。次に2%FBSを含む培地にヒト微小血管内皮細胞が懸濁され、24穴マイクロプレートに $10^4$ 細胞/0.5ml/ウェルで分注された。その後、ヒト微小血管内皮細胞は5%二酸化炭素存在下、37℃で4日間培養された。そして、細胞増殖活性の測定にはWST-1法を用いた。反応液を96穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーによって、450nm-690nmの吸光度を測定し、細胞増殖活性が調べられた。

【0143】FNCBDと比べて、明らかにFNCBD-VEGF121、FNCBD-VEGF165はヒト微小血管内皮細胞に対して濃度依存的に細胞増殖活性を示した。従ってFNCBD-VEGF121またはFNCBD-VEGF165は、フィブロネクチン由来のコラーゲン結合性ドメインとVEGF121またはVEGF165とが連結されたハイブリッドポリペプチド(であり、該ハイブリッドポリペプチドは、コラーゲン結合性を示し、コラーゲンに結合後、結合を保持したままか又は徐放されることによりVEGF活性を示すコラーゲン結合性血管新生調節(促進)因子(コラーゲン結合性VEGF)である事が判明した。

【0144】また、FNCBD-VEGF121またはFNCBD-VEGF165の結合したコラーゲンは、コラーゲン結合性VEGF及びコラーゲン由来のポリペプチドを含むバイオマテリアル(血管新生調節因子複合化コラーゲン)といえる。また上記ヒト微小血管内皮細胞の培養法は、血管新生調節因子複合化コラーゲンを用いて血管内皮細胞に対して増殖活性促進の血管新生調節活性を与える方法の一例である。

#### 【0145】

【発明の効果】本発明に係るハイブリッドポリペプチドは、血管新生調節活性およびコラーゲン結合活性の両活性を有し、特にコラーゲン結合後も血管新生調節活性を示す。さらに該ハイブリッドポリペプチドとコラーゲンとの複合化バイオマテリアルは、血管新生調節活性を有する新しいバイオマテリアルとして有用である。これらハイブリッドポリペプチドおよびバイオマテリアルは、ドラッグデリバリーシステム(DDS)として有用であり、具体的に血管新生調節因子の局所維持剤、徐放剤または血管新生調節活性付与剤として有用である。

#### 【0146】

【配列表フリーテキスト】配列番号1

人工配列の説明：ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメインのPCRセンスプライマー

配列番号2

人工配列の説明：ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結

合性ドメインのPCRアンチセンスプライマー

配列番号 3

人工配列の説明：修飾されたヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメインをコードするDNAの塩基配列

配列番号 4

人工配列の説明：修飾されたヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメインのアミノ酸配列

(2)..(341)：／ノート＝“ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメイン”

配列番号 5

人工配列の説明：ヒト血管内皮細胞増殖因子 121 のPCRセンスプライマー

配列番号 6

人工配列の説明：ヒト血管内皮細胞増殖因子 121 のPCRアンチセンスプライマー

配列番号 7

人工配列の説明：エンテロキナーゼ認識配列が付加されたヒト血管内皮細胞増殖因子 121 をコードするDNAの塩基配列

配列番号 8

人工配列の説明：エンテロキナーゼ認識配列が付加されたヒト血管内皮細胞増殖因子 121 のアミノ酸配列

(1)..(5)：／ノート＝“エンテロキナーゼ認識配列”

(6)..(126)：／ノート＝“ヒト血管内皮細胞増殖因子 121 ”

配列番号 9

人工配列の説明：ヒト血管内皮細胞増殖因子 165 のPCRセンスプライマー配列番号 10

人工配列の説明：ヒト血管内皮細胞増殖因子 165 のPCRアンチセンスプライマー

配列番号 11

人工配列の説明：エンテロキナーゼ認識配列が付加されたヒト血管内皮細胞増殖因子 165 をコードするDNAの塩基配列

配列番号 12

人工配列の説明：エンテロキナーゼ認識配列が付加され\*

\* ヒト血管内皮細胞増殖因子 165 のアミノ酸配列

(1)..(5)：／ノート＝“エンテロキナーゼ認識配列”

(6)..(170)：／ノート＝“ヒト血管内皮細胞増殖因子 165 ”

配列番号 13

人工配列の説明：ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメインとヒト血管内皮細胞増殖因子 121 からなるハイブリッドポリペプチドをコードするDNAの塩基配列

10 配列番号 14

人工配列の説明：ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメインとヒト血管内皮細胞増殖因子 121 から成るハイブリッドポリペプチドのアミノ酸配列

(2)..(341)：／ノート＝“ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメイン”

(343)..(347)：／ノート＝“エンテロキナーゼ認識配列”

(348)..(468)：／ノート＝“ヒト血管内皮細胞増殖因子 121 ”

20 配列番号 15

人工配列の説明：ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメインとヒト血管内皮細胞増殖因子 165 から成るハイブリッドポリペプチドをコードするDNAの塩基配列

配列番号 16

人工配列の説明：ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメインとヒト血管内皮細胞増殖因子 165 から成るハイブリッドポリペプチドのアミノ酸配列

(2)..(341)：／ノート＝“ヒト・フィブロネクチンコラーゲン結合性ドメイン”

30 配列番号 17

(343)..(347)：／ノート＝“エンテロキナーゼ認識配列”

(348)..(512)：／ノート＝“ヒト血管内皮細胞増殖因子 165 ”

【 0 1 4 7 】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Terumo Corporation  
 <120> Collagen-Binding Angiogenesis Modulating Factor  
 <130> TE0000097  
 <160> 16  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR Sense  
 Primer for Human Fibronectin Collagen-Binding  
 Domain

35

36

&lt;400&gt; 1

gaqqtaccat qgtacatatg qcaqctgttt accaaccqca gcctcaccc

49

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Antisense  
Primer for Human Fibronectin Collagen-Binding  
Domain

&lt;400&gt; 2

cqqqatcctt actcgaqcca ctqqatqqq tqqgaqttq gctqac

46

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1053

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Modified Human  
Fibronectin Collagen-Binding Domain

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; conflict

&lt;222&gt; (109)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; conflict

&lt;222&gt; (206)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; conflict

&lt;222&gt; (270)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; conflict

&lt;222&gt; (374)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; conflict

&lt;222&gt; (681)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (16)..(1044)

&lt;400&gt; 3

qgtaccatqg tacat atq gca qct qtt tac caa ccq caq cct cac ccc caq

51

Met Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln

1

5

10

cct cct ccc tat ggc cac tgt qtc aca gac agt ggt gtg qtc tac tct

99

Pro Pro Pro Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser

15

20

25

gtg qgg atg caq tqg ctg aag aca caa qga aat aag caa atg ctt tqc

147

Val Gly Met Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys

30

35

40

37	38
acg tgc ctg qgc aac qga qtc aqc tgc caa qag aca qct qta acc caq	195
Thr Cys Leu Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln	
45 50 55 60	
act tac qgt qgc aac tca aat qga qag cca tgt gtc tta cca ttc acc	243
Thr Tyr Gly Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr	
65 70 75	
tac aat qgc aag acg ttc tac tcc tgc acc aca gaa ggg cga caq gac	291
Tyr Asn Gly Arg Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp	
80 85 90	
qga cat ctt tgg tgc aqc aca act tcg aat tat qag caq gac caq aaa	339
Gly His Leu Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys	
95 100 105	
tac tct ttc tgc aca qac cac act qtt ttg qtt caq act cga qga qga	387
Tyr Ser Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly	
110 115 120	
aat tcc aat qgt gcc ttg tgc cac ttc ccc ttc cta tac aac aac cac	435
Asn Ser Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His	
125 130 135 140	
aat tac act gat tgc act tct qag qgc aga aqa gac aac atq aaq tgg	483
Asn Tyr Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp	
145 150 155	
tgt ggg acc aca caq aac tat gat gcc gac caq aag ttt ggg ttc tgc	531
Cys Gly Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys	
160 165 170	
ccc atq qct qcc cac qag qaa atc tgc aca acc aat qaa qgg qtc atq	579
Pro Met Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met	
175 180 185	
tac cgc att qga gat cag tgg gat aaq caq cat gac atg qgt cac atg	627
Tyr Arg Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met	
190 195 200	
atg aag tgc acg tgt gtt qgg aat ggt cgt qgg qaa tgg aca tgc att	675
Met Arg Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile	
205 210 215 220	
qcc tac tcg caq ctt cga gat cag tgc att gtt gat gac atc act tac	723
Ala Tyr Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr	
225 230 235	
aat gtg aac qac aca ttc cac aag cgt cat qaa qag qgg cac atg ctg	771
Asn Val Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu	
240 245 250	
aac tgt aca tgc ttc qgt caq ggt cgg qgc aag tgg aag tgt gat ccc	819
Asn Cys Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro	
255 260 265	
gtc gac caa tgc caq gat tca qag act qgg acg ttt tat caa att qga	867
Val Asp Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly	
270 275 280	
gat tca tgg qag aag tat gtg cat ggt gtc aqa tac caq tgc tac tgc	915
Asp Ser Trp Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys	
285 290 295 300	
tat ggc cgt qgc att qgg qag tgg cat tgc caa cct tta caq acc tat	963

39 40  
 Tyr Gly Arg Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr  
 305 310 315  
 cca agc tca agt qgt cct qtc gaa gta ttt atc act gaa act ccg agt 1011  
 Pro Ser Ser Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser  
 320 325 330  
 caq ccc aac tcc cac ccc atc caq tqg ctc gaa taaggatcc 1053  
 Gln Pro Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Leu Glu  
 335 340

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 343

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Modified Human  
 Fibronectin Collagen-Binding Domain

&lt;400&gt; 4

Met Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Tyr  
 1 5 10 15  
 Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met Gln  
 20 25 30  
 Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu Gly  
 35 40 45  
 Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly Gly  
 50 55 60  
 Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp Gly His Leu Trp  
 85 90 95  
 Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser Phe Cys  
 100 105 110  
 Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser Asn Gly  
 115 120 125  
 Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr Thr Asp  
 130 135 140

Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met Ala Ala  
 165 170 175  
 His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg Ile Gly  
 180 185 190  
 Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg Cys Thr  
 195 200 205  
 Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr Ser Gln  
 210 215 220  
 Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val Asn Asp  
 225 230 235 240  
 Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys Thr Cys  
 245 250 255  
 Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp Gln Cys



41 260 265 270 42

Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp Glu

275 280 285

Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly Arg Gly

290 295 300

Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser Ser Ser

305 310 315 320

Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro Asn Ser

325 330 335

His Pro Ile Gln Trp Leu Glu

340

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Sense

Primer for Human Vascular Endothelial Growth

Factor 121

<400> 5

gtgtcgcacga ccatgataag gcacccatgg cagaaggagg aggg 44

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Antisense

Primer for Human Vascular Endothelial Growth

Factor 121

<400> 6

ggaattctta ccgcctcggc ttgtcacatt t 31

<210> 7

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Human Vascular

Endothelial Growth Factor 121 with Enterokinase

Recognition Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(381)

<400> 7

gtc gac gac gat gat aag qca ccc atg qca qaa qga qga qgg caq aat 48

Asp Asp Asp Asp Lys Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn

1 5 10 15

cat cac qaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat caq cgc agc tac tqc 96

43 44

His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys

20 25 30

cat cca atc gaq acc ctg qtg qac atc ttc caq gaq tac cct gat gaq 144

His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu

35 40 45

atc gaq tac atc ttc aag cca tcc tgt qtg ccc ctg atg cqa tqc ggg 192

Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly

50 55 60

ggc tqc tqc aat qac gaq ggc ctg gaq tgt qtg ccc act gaq gaq tcc 240

Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser

65 70 75

aac atc acc atg caq att atg cgg atc aaa cct cac caa ggc caq cac 288

Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His

80 85 90 95

ata gga gaq atg aqc ttc cta caq cac aac aaa tgt gaa tqc aqa cca 336

Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro

100 105 110

aaq aaa gat aqa gca aqa caa gaa aaa tgt qac aag ccg agq cgg 381

Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg

115 120 125

taaqaattc 390

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Human Vascular  
Endothelial Growth Factor 121 with Enterokinase  
Recognition Sequence

&lt;400&gt; 8

Asp Asp Asp Asp Lys Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His

1 5 10 15

His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His

20 25 30

Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile

35 40 45

Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly

50 55 60

Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn

65 70 75 80

Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile

85 90 95

Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys

100 105 110

Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg

115 120 125

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

45

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Sense  
Primer for Human Vascular Endothelial Growth  
Factor 165

<400> 9  
qtgtcgcacga ccatgataag qcacccatgg cagaaggagg aagg 44

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Antisense  
Primer Human Vascular Endothelial Growth Factor  
165

<400> 10  
ggaattctta ccgcctcggc ttgtcacatc t 31

<210> 11

<211> 522

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Human Vascular  
Endothelial Growth Factor 165 with Enterokinase  
Recognition Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(513)

<400> 11

gtc gac gac gat gat aag qca ccc atg qca qaa gga gga ggg caq aat 48  
Asp Asp Asp Asp Lys Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn  
1 5 10 15

cat cac qaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat caq cgc aqc tac tgc 96  
His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys  
20 25 30

cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc caq gag tac cct gat gag 144  
His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu  
35 40 45

atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggg 192  
Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly  
50 55 60

ggc tgc tgc aat gac gag ggc ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc 240  
Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser  
65 70 75

aac atc acc atg caq att atg cgg atc aaa cct cac caa ggc caq cac 288  
Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His  
80 85 90 95

ata gga gag atg aqc ttc cta caq cac aac aaa tgt qaa tgc aqa cca 336  
Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro

47

48

100 105 110  
 aaq aaa qat aqa gca aqa caa qaa aat ccc tqt ggg cct tgc tca gaa 384  
 Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu  
 115 120 125  
 ccg aqa aaq cat ttq ttt qta caa qat ccg caq acg tqt aaa tqt tcc 432  
 Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser  
 130 135 140  
 tgc aaa aac aca qac tcg cgt tgc aaq gcg aqq caq ctt gag tta aac 480  
 Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn  
 145 150 155  
 qaa cgt act tgc aqa tgt qac aaq ccg aqq ccg taagaattc 522  
 Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
 160 165 170

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 170

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Human Vascular  
 Endothelial Growth Factor 165 with Enterokinase  
 Recognition Sequence

&lt;400&gt; 12

Asp Asp Asp Asp Lys Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His  
 1 5 10 15  
 His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His  
 20 25 30  
 Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile  
 35 40 45  
 Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly  
 50 55 60

Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile  
 85 90 95  
 Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys  
 100 105 110  
 Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg  
 115 120 125  
 Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys  
 130 135 140  
 Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu  
 145 150 155 160  
 Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
 165 170

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1428

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Hybrid

49

50

Polypeptide of Human Fibronectin Collagen-Binding  
Domain and Human Vascular Endothelial Growth  
Factor 121

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (16)..(1419)

&lt;400&gt; 13

```

qgtaccatqg tacat atg gca qct gtt tac caa ccg cag cct cac ccc caq      51
      Met Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln
              1              5              10
cct cct ccc tat ggc cac tgt gtc aca gac agt ggt gtg gtc tac tct      99
Pro Pro Pro Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser
              15              20              25
gtg ggg atg cag tgg ctg aag aca caa gga aat aag caa atg ctt tgc      147
Val Gly Met Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys
              30              35              40
acg tgc ctg ggc aac gga gtc agc tgc caa gac aca qct gta acc caq      195
Thr Cys Leu Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln
              45              50              55              60
act tac ggt ggc aac tca aat gga gag cca tgt gtc tta cca ttc acc      243
Thr Tyr Gly Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr
              65              70              75

tac aat ggc agg acg ttc tac tcc tgc acc aca gaa ggg cga cag gac      291
Tyr Asn Gly Arg Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp
              80              85              90
gga cat ctt tgg tgc agc aca act tcg aat tat gag cag gac cag aaa      339
Gly His Leu Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys
              95              100              105
tac tct ttc tgc aca gac cac act gtt ttg gtt cag act cga gga gga      387
Tyr Ser Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly
              110              115              120
aat tcc aat ggt qcc ttg tgc cac ttc ccc ttc cta tac aac aac cac      435
Asn Ser Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His
              125              130              135              140
aat tac act gat tgc act tct gag ggc aga aqa gac aac atg aaq tgg      483
Asn Tyr Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp
              145              150              155
tgt ggg acc aca cag aac tat gat gcc gac cag aag ttt ggg ttc tgc      531
Cys Gly Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys
              160              165              170
ccc atg qct qcc cac gag gaa atc tgc aca acc aat gaa ggg gtc atg      579
Pro Met Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met
              175              180              185
tac cgc att gga gat cag tgg gat aag cag cat gac atg ggt cac atg      627
Tyr Arg Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met
              190              195              200
atg agg tgc acg tgt gtt ggg aat ggt cgt ggg gaa tgg aca tgc att      675
Met Arg Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile
              205              210              215              220

```

51	52
qcc tac tcq caq ctt cqa qat caq tqc att qtt qat qac atc act tac	723
Ala Tyr Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr	
225 230 235	
aat qtg aac qac aca ttc cac aaq cqt cat qaa gag ggg cac atq ctg	771
Asn Val Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu	
240 245 250	
aac tgt aca tqc ttc ggt caq qgt cgg ggc aag tgg aag tgt gat ccc	819
Asn Cys Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro	
255 260 265	
qtc qac caa tqc caq qat tca gag act ggg acg ttt tat caa att gga	867
Val Asp Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly	
270 275 280	
qat tca tqg gag aag tat qtg cat qgt qtc aqa tac caq tqc tac tqc	915
Asp Ser Trp Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys	
285 290 295 300	
tat ggc cgt ggc att ggg gag tgg cat tqc caa cct tta caq acc tat	963
Tyr Gly Arg Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr	
305 310 315	
cca agc tca agt ggt cct qtc gaa gta ttt atc act gag act ccg agt	1011
Pro Ser Ser Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser	
320 325 330	
caq ccc aac tcc cac ccc atc caq tqg ctc qac qac qat qat aag gca	1059
Gln Pro Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Leu Asp Asp Asp Asp Lys Ala	
335 340 345	
ccc atg qca gaa gga gga ggg caq aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc	1107
Pro Met Ala Glu Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe	
350 355 360	
atq gat qtc tat caq cgc aqc tac tqc cat cca atc gag acc ctg qtg	1155
Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val	
365 370 375 380	
qac atc ttc caq gag tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca	1203
Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro	
385 390 395	
tcc tgt qtg ccc ctg atg cqa tqc ggg ggc tqc tqc aat qac gag ggc	1251
Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly	
400 405 410	
ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg caq att atg	1299
Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met	
415 420 425	
cgg atc aaa cct cac caa ggc caq cac ata gga gag atg agc ttc cta	1347
Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu	
430 435 440	
caq cac aac aaa tgt qaa tqc aqa cca aag aaa gat aqa qca aqa caa	1395
Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln	
445 450 455 460	
qaa aaa tgt qac aag ccg aag cgg taagaattc	1428
Glu Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
465	

53

54

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 468

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Hybrid

Polypeptide of Human Fibronectin Collagen-Binding

Domain and Human Vascular Endothelial Growth

Factor 121

&lt;400&gt; 14

Met Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro Tyr

1 5 10 15

Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met Gln

20 25 30

Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu Gly

35 40 45

Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly Gly

50 55 60

Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn Gly Arg

65 70 75 80

Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp Gly His Leu Trp

85 90 95

Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser Phe Cys

100 105 110

Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser Asn Gly

115 120 125

Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr Thr Asp

130 135 140

Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly Thr Thr

145 150 155 160

Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met Ala Ala

165 170 175

His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg Ile Gly

180 185 190

Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg Cys Thr

195 200 205

Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr Ser Gln

210 215 220

Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val Asn Asp

225 230 235 240

Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys Thr Cys

245 250 255

Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp Gln Cys

260 265 270

Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp Glu

275 280 285

Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly Arg Gly

290 295 300

Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser Ser Ser

305 310 315 320



55  
 Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro Asn Ser  
 325 330 335

His Pro Ile Gln Trp Leu Asp Asp Asp Asp Lys Ala Pro Met Ala Glu  
 340 345 350

Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr  
 355 360 365

Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln  
 370 375 380

Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro  
 385 390 395 400

Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val  
 405 410 415

Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro  
 420 425 430

His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys  
 435 440 445

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Cys Asp  
 450 455 460

Lys Pro Arg Arg  
 465

<210> 15  
 <211> 1560  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Hybrid  
 Polypeptide of Human Fibronectin Collagen-Binding  
 Domain and Human Vascular Endothelial Growth  
 Factor 165  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (16)..(1551)  
 <400> 15

ggtaccatgq tacat atg gca gct gtt tac caa ccg caq cct cac ccc caq 51  
 Met Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln  
 1 5 10

cct cct ccc tat ggc cac tgt gtc aca gac agt ggt gtg gtc tac tct 99  
 Pro Pro Pro Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser  
 15 20 25

gtg ggg atg caq tqg ctg aaq aca caa qga aat aaq caa atg ctt tqc 147  
 Val Gly Met Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys  
 30 35 40

acg tqc ctg ggc aac gga gtc agc tqc caa qag aca gct gta acc caq 195  
 Thr Cys Leu Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln  
 45 50 55 60

act tac ggt ggc aac tca aat qga qag cca tgt gtc tta cca ttc acc 243  
 Thr Tyr Gly Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr  
 65 70 75

tac aat ggc agq acg ttc tac tcc tqc acc aca qaa ggg cga caq qac 291

57		58
Tyr Asn Gly Arg Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp		
80	85	90
gga cat ctt tgg tgc agc aca act tcg aat tat gag cag gac caa aaa	339	
Gly His Leu Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys		
95	100	105
tac tct ttc tgc aca gac cac act gtt ttg qtt cag act cga gga gga	387	
Tyr Ser Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly		
110	115	120
aat tcc aat ggt gcc ttg tgc cac ttc ccc ttc cta tac aac aac cac	435	
Asn Ser Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His		
125	130	135
aat tac act gat tgc act tct gag gcc aca aca gac aac atg aag tgg	483	
Asn Tyr Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp		
145	150	155
tgt ggg acc aca cag aac tat gat gcc gac cag aag ttt ggg ttc tgc	531	
Cys Gly Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys		
160	165	170
ccc atg qct gcc cac gag gaa atc tgc aca acc aat gaa ggg gtc atg	579	
Pro Met Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met		
175	180	185
tac cgc att gga gat cag tgg gat aag cag cat gac atg ggt cac atg	627	
Tyr Arg Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met		
190	195	200
atg agg tgc acg tgt gtt ggg aat ggt cgt ggg gaa tgg aca tgc att	675	
Met Arg Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile		
205	210	215
gcc tac tcg cag ctt cga gat cag tgc att gtt gat gac atc act tac	723	
Ala Tyr Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr		
225	230	235
aat gtg aac gac aca ttc cac aag cgt cat gaa gag ggg cac atg ctg	771	
Asn Val Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu		
240	245	250
aac tgt aca tgc ttc ggt cag ggt cgg gcc aag tgg aag tgt gat ccc	819	
Asn Cys Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro		
255	260	265
gtc gac caa tgc cag gat tca gag act ggg acg ttt tat caa att gga	867	
Val Asp Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly		
270	275	280
gat tca tgg gag aag tat gtg cat ggt gtc aca tac cag tgc tac tgc	915	
Asp Ser Trp Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys		
285	290	295
tat gcc cgt gcc att ggg gag tgg cat tgc caa cct tta cag acc tat	963	
Tyr Gly Arg Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr		
305	310	315
cca agc tca agt ggt cct gtc gaa gta ttt atc act gag act ccg agt	1011	
Pro Ser Ser Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser		
320	325	330
cag ccc aac tcc cac ccc atc cag tgg ctc gac gac gat gat aag gca	1059	
Gln Pro Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Leu Asp Asp Asp Asp Lys Ala		

59 60

335 340 345

ccc atg qca gaa gga gga ggg caq aat cat cac qaa qtg qtg aaq ttc 1107  
Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe

350 355 360

atg gat qtc tat caq cgc aqc tac tqc cat cca atc qag acc ctg qtg 1155  
Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val

365 370 375 380

qac atc ttc caq gag tac cct gat qag atc qag tac atc ttc aaq cca 1203  
Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro

385 390 395

tcc tgt qtg ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc aat qac qag ggc 1251  
Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly

400 405 410

ctg gag tgt qtg ccc act qag gag tcc aac atc acc atg cag att atg 1299  
Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met

415 420 425

cgg atc aaa cct cac caa ggc caq cac ata gga gag atg aqc ttc cta 1347  
Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu

430 435 440

caq cac aac aaa tgt gaa tgc aga cca aaq aaa gat aqa qca aqa caa 1395  
Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln

445 450 455 460

qaa aat ccc tgt ggg cct tgc tca gag cgg aga aag cat ttg ttt gta 1443  
Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val

465 470 475

caa gat ccg cag acg tgt aaa tgt tcc tgc aaa aac aca qac tcg cgt 1491  
Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg

480 485 490

tgc aaq gcg aqg caq ctt qag tta aac qaa cgt act tgc aqa tgt qac 1539  
Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp

495 500 505

aaq ccg aqg cgg taagaattc 1560  
Lys Pro Arg Arg

510

<210> 16

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Hybrid  
Polypeptide of Human Fibronectin C11agen-Binding  
Domain and Human Vascular Endothelial Growth  
Factor 165

<400> 16

Met Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro Tyr  
1 5 10 15  
Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met Gln  
20 25 30  
Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu Gly  
35 40 45  
Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly Gly

61																							
50						55						60											
Asn	Ser	Asn	Gly	Glu	Pro	Cys	Val	Leu	Pro	Phe	Thr	Tyr	Asn	Gly	Arg								
65						70						75						80					
Thr	Phe	Tyr		Ser	Cys	Thr	Thr	Glu	Gly	Arg	Gln	Asp	Gly	His	Leu	Trp							
85						90						95											
Cys	Ser	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr		Glu	Gln	Asp	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Cys							
100						105						110											
Thr	Asp	His	Thr	Val	Leu	Val		Gln	Thr	Arg	Gly	Gly	Asn	Ser	Asn	Gly							
115						120						125											
Ala	Leu	Cys	His	Phe	Pro	Phe		Leu	Tyr	Asn	Asn	His	Asn	Tyr	Thr	Asp							
130						135						140											
Cys	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Arg		Asp	Asn	Met	Lys	Trp	Cys	Gly	Thr	Thr							
145						150						155						160					
Gln	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asp	Gln	Lys	Phe	Gly	Phe	Cys	Pro	Met	Ala	Ala								
165						170						175											
His	Glu	Glu	Ile	Cys	Thr	Thr		Asn	Glu	Gly	Val	Met	Tyr	Arg	Ile	Gly							
180						185						190											
Asp	Gln	Trp	Asp	Lys	Gln	His		Asp	Met	Gly	His	Met	Met	Arg	Cys	Thr							
195						200						205											
Cys	Val	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly		Glu	Trp	Thr	Cys	Ile	Ala	Tyr	Ser	Gln							
210						215						220											
Leu	Arg	Asp	Gln	Cys	Ile	Val		Asp	Asp	Ile	Thr	Tyr	Asn	Val	Asn	Asp							
225						230						235						240					
Thr	Phe	His	Lys	Arg	His	Glu	Glu	Gly	His	Met	Leu	Asn	Cys	Thr	Cys								
245						250						255											
Phe	Gly	Gln	Gly	Arg	Gly	Arg		Trp	Lys	Cys	Asp	Pro	Val	Asp	Gln	Cys							
260						265						270											
Gln	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Thr		Phe	Tyr	Gln	Ile	Gly	Asp	Ser	Trp	Glu							
275						280						285											
Lys	Tyr	Val	His	Gly	Val	Arg		Tyr	Gln	Cys	Tyr	Cys	Tyr	Gly	Arg	Gly							
290						295						300											
Ile	Gly	Glu	Trp	His	Cys	Gln		Pro	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Ser							
305						310						315						320					
Gly	Pro	Val	Glu	Val	Phe	Ile		Thr	Glu	Thr	Pro	Ser	Gln	Pro	Asn	Ser							
325						330						335											
His	Pro	Ile	Gln	Trp	Leu	Asp		Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Pro	Met	Ala	Glu							
340						345						350											
Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His		Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr							
355						360						365											
Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro		Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln							
370						375						380											
Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu		Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro							
385						390						395						400					
Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys		Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val							
405						410						415											
Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile		Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro							
420						425						430											
His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly		Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys							

63  
 435 440 445  
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys  
 450 455 460  
 Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln  
 465 470 475 480  
 Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg  
 485 490 495  
 Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
 500 505 510

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	シーマコード (参考)
C 0 7 K 14/78		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		A 6 1 K 37/02	
5/10		C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 N 15/09	Z N A	15/00	Z N A A

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 CA07 CA12  
 DA06 EA04 GA11 HA01 HA03  
 4B065 AA26X AA93Y AB01 BA02  
 BD16 BD17 CA24 CA44  
 4C076 AA95 CC11 CC41 EE41 EE59  
 FF31 FF67 FF70  
 4C084 AA02 BA44 DB57 NA03 NA06  
 NA12 NA13 ZA442  
 4H045 AA10 BA41 CA40 EA20 EA34  
 FA72 FA74 GA01 GA10